

**Vergleichende Untersuchungen zur Embryonalentwicklung
basaler und abgeleiteter Nematoden**

Ein Beitrag zum Verständnis der Evolution von Entwicklungsprozessen

In a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Jens Schulze
aus Helmstedt

Köln

2008

Berichtersteller:

Prof. Dr. Einhard Schierenberg

Prof. Dr. Siegfried Roth

Tag der letzten mündlichen Prüfung:

02.07.2008

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>C. elegans</i> als Referenzsystem	3
1.2 Ziele der Arbeit	12
2. Phylogenie	13
3. Material und Methoden	16
3.1 Nematoden	17
3.2 Nematodenisolierung und Bestimmung	18
3.2.1 Isolation von Nematoden aus Bodenproben	18
3.2.2 Isolation von Nematoden aus Salzbodenproben	18
3.2.3 Isolation parasitärer Nematoden	18
3.2.4 Bestimmung isolierter Nematoden	19
3.3 Zucht von Bodennematoden	19
3.3.1 <i>E. coli</i> als Futterquelle	19
3.3.2 Kryokonservierung von <i>E. coli</i>	19
3.3.3 Kryokonservierung von Bodennematoden	20
3.3.4 Reinigung von verunreinigten Nematodenkulturen	20
3.4 Zucht von <i>Romanormis culicivorax</i>	20
3.4.1 Dauerkultur von <i>R. culicivorax</i>	21
3.4.2 Arbeitskultur von <i>R. culicivorax</i>	21
3.5 Präparation von Embryonen	21
3.5.1 Präparate für die 4D-Mikroskopie	21
3.5.2 Präparate für Antikörpermarkierungen	21
3.5.3 Agarose-Objektträger	23
3.5.4 Poly-L-Lysin Objektträger	23
3.5.5 Versiegelung von Objektträgern	23
3.6 Lichtmikroskopie	24
3.7 Die 4D-Mikroskopie	25
3.8 Elektronenmikroskopie	27
3.9 Laserablationsexperimente	28
3.10 Zentrifugationsexperimente	29
3.11 Melaninnachweise	30
3.12 Nomenklatur	31
3.13 Lösungen	32
3.14 Medien	33
4. Ergebnisse	34
4.1 Untersuchungen an Vertretern der Rhabditia	35

4.1.1	Untersuchungen an <i>Diploscapter coronatus</i>	35
4.1.2	Untersuchungen an <i>Acrobeloides nanus</i>	40
4.1.3	Untersuchungen an <i>Acrobeloides sp.</i> (PS1146).....	43
4.1.4	Untersuchungen an <i>Panagrolaimus sp.</i> (ES444).....	46
4.1.5	Schlussfolgerungen aus den Untersuchungen an den Rhabditia.....	49
4.2	Untersuchungen an Vertretern der Chromadoria.....	50
4.2.1	Untersuchungen an <i>Plectus sp.</i> (ES601).....	50
4.2.2	Schlussfolgerungen aus den Untersuchungen an den Chromadoria	56
4.3	Untersuchungen an <i>Romanomermis culicivorax</i>	57
4.3.1	Keimbahn-Soma Trennung	57
4.3.2	Asymmetrische zytoplasmatische Segregation einer braunen Farbkomponente	58
4.3.3	Normalentwicklung nach experimenteller Fehlverteilung der Farbkomponente	59
4.3.4	Die Farbkomponente als möglicher Sonnenschutz.....	62
4.3.5	Segregation cytoplasmatischer Komponenten.....	63
4.3.6	Frühe Musterbildung, Achsendetermination und Polaritätsumkehr	66
4.3.7	Die RFM als Verankerungspunkt zwischen Zellen.....	68
4.3.8	Laserbestrahlung der RFM führt zum Verlust von Asymmetrien	69
4.3.9	In polarisierten Zellen bilden sich Kappen von Interphasemikrotubuli.....	71
4.3.10	In <i>R. culicivorax</i> tragen Gründerzellen weitgehend monoklonal zu Organen bei	74
4.3.11	<i>R. culicivorax</i> besitzt keine Regulationsfähigkeit	77
4.3.12	Gastrulation und Organogenese von Verdauungstrakt und Körpermuskulatur... ..	78
4.3.13	Es gibt in <i>R. culicivorax</i> keine Hinweise für eine Darminduktion	82
4.3.14	Ablation der RFM beeinträchtigt Gastrulation und Zelldifferenzierung	84
4.3.15	Hypodermisentwicklung – Ausbildung von repetitiven Elementen	86
4.4	Untersuchungen an Vertretern der Dorylaimia	90
4.4.1	Untersuchungen an <i>Prionchulus sp.</i>	90
4.4.2	Untersuchungen an <i>Dorylaimus sp.</i>	93
4.4.3	Untersuchungen an <i>Trichuris muris</i>	94
4.4.4	Schlussfolgerungen zu den Untersuchungen an Vertretern der Dorylaimia ...	97
4.5	Untersuchungen an Vertretern der Enoplia	98
4.5.1	Untersuchungen an <i>Tobrilus stefanskii</i>	98
4.5.2	Schlussfolgerungen zu den Untersuchungen an Vertretern der Enoplia	101

5.	Diskussion	102
6.	Zusammenfassung	134
7.	Abstract.....	136
8.	Literaturverzeichnis.....	138
9.	Anhänge	147

1. Einleitung

Der Stamm Nematoda ist einer der am weitest verbreiteten Taxa im Tierreich und seine Artenzahl variiert je nach Schätzung zwischen 100.000 und 100.000.000 (Meldal et al., 2007). Die ältesten Fossilienfunde sind etwa 30 Millionen Jahre alte Bernsteineinschlüsse, der Ursprung der Nematoda wird in verschiedenen Schätzungen jedoch auf 550 bis 1000 Millionen Jahre zurückdatiert (De Ley und Blaxter, 2002). Freilebende Vertreter können in praktisch allen terrestrischen, aquatischen und marinen Habitaten gefunden werden (Convey und McInnes, 2005; Dorris et al., 1999). Mit teilweise mehr als einer Million Individuen pro m² Bodenfläche machen die Nematoden einen großen Anteil aller terrestrischen mehrzelligen tierischen Individuen aus und sind folglich ein wichtiger Faktor in vielen Ökosystemen (Platt, 1994). Angepasst an ihre Habitate nutzen die unterschiedlichen Arten spezielle Bakterien, Algen, Kieselalgen, Pilze, Protozoen, tierische oder pflanzliche Gewebe, teilweise sogar andere Nematoda als Nahrungsquelle (Munn und Munn, 2002). Die spezialisierten parasitären Vertreter benutzen eine große Zahl von unterschiedlichen Wirten im Tier- und Pflanzenreich und verursachen ein breites Spektrum an Krankheiten und hohen agrarwirtschaftlichen Schaden (Lee, 2002; Manzanilla-López et al., 2004; Munn und Munn, 2002). Insgesamt hat sich die parasitäre Lebensweise mindestens siebenmal unabhängig voneinander entwickelt (Blaxter et al., 1998). Neben der zweigeschlechtlichen Fortpflanzung kann bei den Nematoda auch die hermaphroditische, parthenogenetische und pseudogame Fortpflanzung, sogar ein vom Lebenszyklus abhängiger Wechsel des Fortpflanzungsmodus beobachtet werden (Justine, 2002; Mittwoch, 1978). Sie gelten als Tiergruppe mit einer sehr homogenen Gestalt, unsegmentierter „fadenförmiger“ Würmer. Vereinfacht lässt sich ihr Bauplan als zwei konzentrische durch ein Pseudocoel getrennte zylindrische Röhren beschreiben, deren Enden spitz zulaufen. Dabei sind die Gonade und der Verdauungstrakt, der sich in Pharynx und Darm unterteilt, durch die flüssigkeitsgefüllte Leibeshöhle von einem Hautmuskelschlauch umhüllt. Anstelle eines Exo- oder Endoskeletts ist ein innerer hydrostatischer Druck (Hydroskelett) gestaltgebend und die Körpermuskulatur ist „schräggestreift“. Das exkretorische System besteht aus einer einzelnen, so genannten H-Zelle. Diese bildet exkretorische Kanäle, die entlang der anterior-posterioren Körperachse führen. Sie verfügen weder über ein Kreislaufsystem, noch benötigen sie aufgrund ihres Oberflächen-Volumen-Verhältnisses ein respiratorisches System, obwohl sie zwischen 0,5 mm und 8 m Länge variieren. Verschiedene Autoren haben sich ausführlich mit der vergleichenden Anatomie der Nematoda beschäftigt (Ewald, 2007; Gibbons, 2002). Die phylogenetische Einordnung der Nematoda ins Tierreich und untereinander ist in Kapitel 2

wiedergegeben. Dabei unterteilt ein moderner phylogenetischer Stammbaum (Holterman et al., 2006) das Taxon in zwölf Claden. Ein vereinfachter Bauplan des Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* (Clade 9) ist in Abb. 1 dargestellt.

Die Erforschung der Embryonalentwicklung der Nematoda nahm ihren Anfang mit dem „Pferdespulwurm“ *Ascaris megalocephala* (Clade 8; Boveri, 1887; 1892; 1899; 1910; Müller, 1903; zur Strassen, 1896). Untersuchungen deckten unter anderem einen invarianten Zellstammbaum, eine frühe Trennung von Keimbahn und Soma sowie Zellkonstanz auf. Lange Zeit galten die Nematoda daraufhin als ein klassisches Beispiel für die zellautonome Entwicklung, bei der die Zellschicksale durch Segregation von intrinsischen Determinanten festgelegt werden. Solch eine Mosaikentwicklung (Roux, 1888) ist unabhängig von Interaktionen mit Nachbarzellen und weist keinerlei regulatives Potential auf, um zum Beispiel verlorene Zellen zu ersetzen. Mit der Etablierung von *C. elegans* als Modellorganismus schienen Untersuchungen die zellautonome Entwicklung der Nematoda zu bestätigen (Cowan und McIntosh, 1985; Laufer et al., 1980; Sulston et al., 1983). Diese Sicht wurde durch die Entdeckung der P-Granula (Strome und Wood, 1982; Strome und Wood, 1983), zytoplasmatischer Komponenten, die während der Entwicklung spezifisch in die Keimbahn segregieren, weiter unterstützt. Erst spätere Experimente zeigten, dass induktive Signale für eine korrekte Schicksalsfestlegung einzelner Zellen nötig sind (Bowerman et al., 1992; Goldstein, 1992; 1993; 1995; Hutter und Schnabel, 1994; 1995a; 1995b; Priess et al., 1987; Schierenberg, 1987; Schlicht und Schierenberg, 1991; Schnabel, 1994; Schnabel, 1995; Wood, 1991). Aufgrund der großen Ähnlichkeit zwischen der Embryonalentwicklung der Modellorganismen *A. megalocephala* und *C. elegans*, in Bezug auf Zellstammbaum, Zellteilungsrythmen, Zellkonstanz, Musterbildung und Gastrulation, wurden diese Erkenntnisse in der Vergangenheit für die Nematoda verallgemeinert. Die Übertragung der erlangten entwicklungsbiologischen Daten von Modellorganismen auf verwandte Organismen muss jedoch unter kritischen Gesichtspunkten geschehen. Modellorganismen werden unter anderem aufgrund ihrer leichten Verfügbarkeit und Zuchtbedingungen, schnellen Generationszeiten und kurzen Entwicklungsdauer sowie geringer Variabilität innerhalb derselben Art ausgewählt. Aber gerade diese Eigenschaften gelten als hochgradig abgeleitete Anpassungen und können schnell zu falschen Schlussfolgerungen in Bezug auf das gesamte Taxon führen (Bolker, 1995).

Nur wenige Publikationen beschäftigen sich neben denen über *A. megalocephala* und *C. elegans* ausführlich mit der Embryonalentwicklung der Nematoda und dann zumeist mit leicht zugänglichen nah verwandten Vertretern aus den Claden 8 und 9. So zeigen vergleichende Untersuchungen zwischen *C. elegans* und *Pellioditis marina* (Clade 9) 95% Übereinstimmung der Zellstammbaumverästelung bei 77% Übereinstimmung der terminalen

Zellschicksale (Houthoofd et al., 2003). Die frühe Musterbildung, Gastrulation, Organogenese und Morphogenese unterscheiden sich jedoch kaum voneinander. Auch Zellstammbaumanalysen der Darmentwicklung weiterer Vertreter aus den Claden 8 und 9 zeigen nur leichte Variationen (Houthoofd et al., 2006; Sulston et al., 1983). Computergestützte Zellstammbaumanalysen deuten auf einen Selektionsdruck hin, der zu einer generellen Vereinfachung von Zellstammbäumen führt (Azevedo et al., 2005) und Ähnlichkeiten zwischen den nah verwandten Vertretern der Claden 8 und 9 erklärt. Untersuchungen an weiter entfernten Vertretern sind weniger ausführlich und decken den phylogenetischen Stammbaum der Nematoda nur lückenhaft ab, zeigen jedoch teilweise gravierende Unterschiede bei der frühen Musterbildung oder Gastrulation (Malakhov, 1994; Malakhov, 1998; Malakhov et al., 1984). So zeigen Untersuchungen an *Enoplus brevis* (Clade 1), abgesehen von der Darmentwicklung, keinerlei erkennbaren Zellstammbaum (Voronov, 1999; Voronov und Panchin, 1998). Beobachtungen an *Tobrilus diversipapillatus* (Clade 1) deckten eine Gastrulation unter Beteiligung eines großen Blastocoels und die Formation dreier Keimblätter auf (Schierenberg, 2005). Dabei offenbaren weder *E. brevis* noch *T. diversipapillatus* eine erkennbare Keimbahn-Soma Aufspaltung oder frühe asymmetrische Zellteilungen. Laserablationsversuche an *Acrobeloides nanus* (Clade 11) zeigen eine für Nematoda bisher unbekannte Fähigkeit zur Regulation, indem sich Zellen nach einem hierarchischen Muster ersetzen können (Wiegner und Schierenberg, 1998; 1999).

Gerade diese Erkenntnisse zeigen, dass die gängige Lehrbuchmeinung, *C. elegans* als allgemeingültiges Referenzsystem der Nematoda zu verwenden, revidiert werden muss. Vielmehr erscheint die Variabilität in der Embryonalentwicklung sehr vielfältig und bedarf weiterer Untersuchungen. Diese Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis der Evolution von entwicklungsbiologischen Prozessen innerhalb der Nematoda liefern.

1.1 *C. elegans* als Referenzsystem

Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Clade 9) besitzt einen invarianten Zellstammbaum, somatische Zellkonstanz bei variabler Keimzellzahl und eine einfache Anatomie (Abb. 1). Er ist der erste Organismus, dessen embryonaler- (Sulston et al., 1983) und postembryonaler- Zellstammbaum (Kimble und Hirsh, 1979; Sulston und Horvitz, 1977) vollständig analysiert wurde. In einer Reihe stammzellartiger Teilungen teilt sich Urkeimbahnzelle (P0) jeweils in eine Propagationszelle (P1-P4) und eine somatische Gründerzelle (Boveri, 1910; Schierenberg, 2004). Sein invarianter Zellstammbaum erlaubt eine Nomenklatur, in der die Gründerzellen (AB, MS, E, C und D) invariant benannt werden und ihre Nachkommen invariant zu bestimmten Zellschicksalen beitragen (Deppe et al., 1978; Sulston et al., 1983).

Ein Zellstammbaumvergleich zwischen *C. elegans* und seinen nahen Verwandten (Houthoofd et al., 2003; Müller, 1903; Zhao et al., 2008) zeigt nur marginale Transformationen der auftretenden Schicksale innerhalb einzelner Gründerzellen. Ein Vergleich zwischen Vertretern der Chromadorea und Enoplea zeigt jedoch, dass in ersteren der Darm von der Gründerzelle E abstammt, in letzteren jedoch von der Gründerzelle AB (Malakhov, 1994). Darüber hinaus decken Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit gravierende Schicksalstransformationen zwischen einzelnen Gründerzellen auf. Folglich ist eine schicksalsunabhängige Nomenklatur zwingend erforderlich, da Zellschicksale innerhalb des Taxons Nematoda nicht an eine spezifische Gründerzelle gekoppelt sind. Durch die Einführung einer zusätzlichen Nomenklaturebene (S-Nomenklatur, Boveri, 1899; 1910) wird die Unterscheidung und Entkopplung zwischen Abstammung (S1-S4) und Schicksal (AB, E, MS, C, D) einer Gründerzelle im invarianten Zellstammbaum ermöglicht. Die S-Nomenklatur ist wertneutral und trifft abgesehen von der Keimbahn keinerlei Aussagen über das Schicksal der somatischen Gründerzellen. In Abb. 2 ist ein embryonaler Zellstammbaum von *C. elegans* dargestellt. Da dieser Organismus als Referenzsystem dient, entsprechen sich die Nomenklatur der Abstammung und des Schicksals (S1=AB, S2a=MS, S2p=E, S3=C, S4=D) und die Transformationen werden erst beim Vergleich mit phylogenetisch entfernteren Arten offensichtlich.

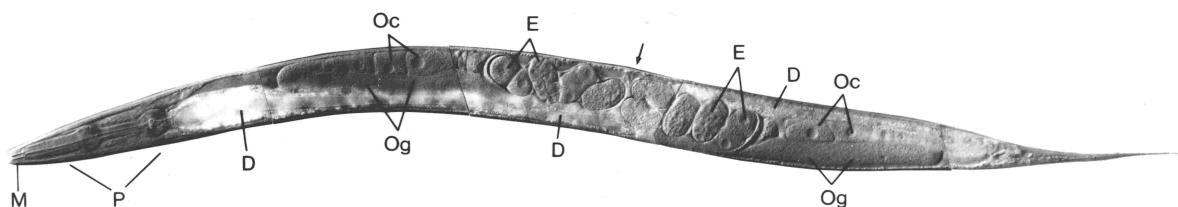


Abb. 1: Die Anatomie von *C. elegans*

Adulter *C. elegans*, Aufnahme von E. Schierenberg. **M)** Mundöffnung, **P)** Pharynx, **D)** Darm **Og)** Oogonien, **Oc)** Oocyten, **E)** Eier, **Pfeil)** Vulva. Aus (Schierenberg, 1986).

C. elegans ist vermutlich der genetisch und morphologisch am besten untersuchte mehrzellige Modellorganismus. Er ist ein protandrischer selbstbefruchtender Hermaphrodit, der eine fakultativ diözische Fortpflanzungsweise zeigt. Sein Geschlecht wird durch die Zahl der Gonosomen (X) bestimmt und durch non-disjunction entstehen unter den Nachkommen eines Hermaphroditen (XX) zu 0,3% Männchen (X0). Ein Hermaphrodit produziert etwa 300 Spermien und kann durch Kreuzung mit Männchen über 1200 befruchtete Eier ablegen, wovon sich die Hälfte der fremdbefruchteten Eier zu Männchen entwickelt. Das L1 Juvenilstadium besitzt beim Schlüpfen 558, adulte Hermaphroditen 959 und adulte Männchen 1031 somatische Zellkerne, wobei jeweils einige Zellen mehrkernig sind. Die

adulten Tiere sind nur etwa 1 mm lang und haben einen Durchmesser von 70 µm. Bei 25°C dauert ein Lebenszyklus von der Befruchtung der Oozyte bis zur Entwicklung des adulten Hermaphroditen etwa 50 Stunden. Die Embryogenese, die sich in eine Proliferations- und eine gestaltgebende Morphogenesephase unterteilen lässt, benötigt hiervon etwa 14 Stunden. In der Postembryonalentwicklung werden bis zum adulten Stadium vier Juvenilstadien (L1-L4), die jeweils mit einer Häutung abgeschlossen werden, durchlaufen (Wood, 1988).

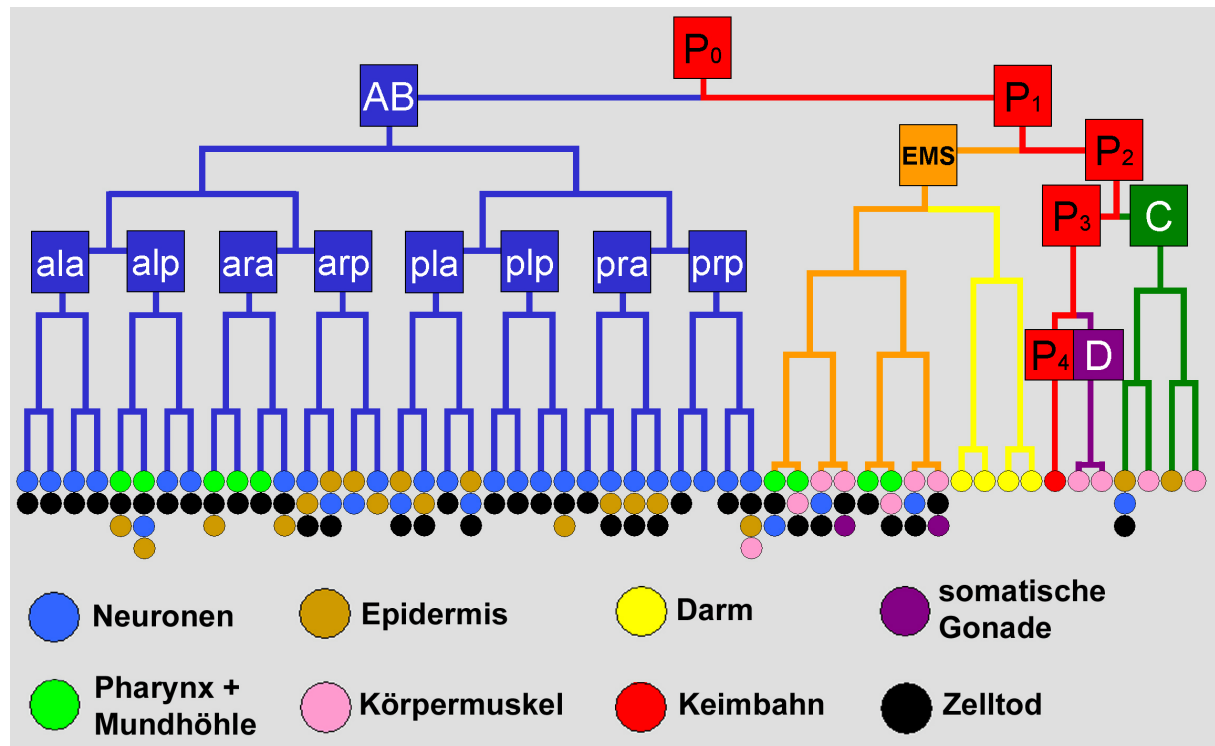


Abb. 2: Zellstammbaum und Zellnomenklatur von *C. elegans*

Modifizierter Zellstammbaum von *C. elegans* (nach Sulston et al., 1983), die Zellen sind nach der S-Nomenklatur benannt (Boveri, 1899; 1910). Die Analyse des Zellstammbaums zeigte, dass die Zellen und Gewebe in *C. elegans* nicht zufällig, sondern nach einem invarianten Muster entstehen. Durch diese Invarianz ist es möglich, für jede Zelle und deren Tochterzellen die Differenzierung zu unterschiedlichen Zelltypen vorherzusagen. Aus der totipotenten P0 gehen durch asymmetrische stammzellartige Teilungen (Schierenberg, 2004) die Gründerzellen S1, S2, S3, S4 sowie die Keimbahnvorläuferzelle P4 hervor. Die endständigen Kreise in diesem Zellstammbaum stellen Schicksale der aus weiteren Teilungen resultierenden Tochterzellen in absteigender Häufigkeit farblich dar. Nur die Gründerzelle E bildet einen einzelnen Gewebetyp monoklonal aus, die restlichen Gründerzellen bilden die übrigen Gewebe polyklonal. Die Tochterzellen einer Gründerzelle werden gemäß ihrer Lage nach der Teilung benannt (Deppe et al., 1978; Sulston et al., 1983). S1a ist die anteriore, die S1p die posteriore Tochterzelle der Gründerzelle S1. S1ar ist die rechte, S1al die linke Tochterzelle von S1a. S1ala ist die anteriore Tochterzelle von S1al, S1alaa ist die anteriore Tochterzelle von S1ala. Dabei werden Tochterzellen mit anteriorer, dorsaler und linker Position, relativ zu ihrer Geschwisterzelle, in einem linken Zweig gestellt, während Zellen mit posteriorer, ventraler und rechter Position einem rechten Zweig des Stammbaums zugeordnet werden.

In *C. elegans* wird erst mit dem Eintritt des Spermiums die Symmetrie der Oocyte gebrochen und der posteriore Pol sowie die anterior-posteriore Körperachse des Eies definiert (Goldstein und Hird, 1996). Nach Interaktion des männlichen Centrosoms mit dem Zellcortex

der befruchteten Oocyte werden die PAR-Proteine und P-Granula asymmetrisch entlang der anterior-posterioren Körperachse verteilt (Cowan und Hyman, 2004a+b; Gönczy und Rose, 2005). In einer Reihe von asymmetrischen stammzellartigen Teilungen der totipotenten P0 entlang der anterior-posterioren Körperachse entstehen die somatischen Gründerzellen sowie P4 (Schierenberg, 2004). Dabei kommen, in einem als Polaritätsumkehr in der Keimbahn beschriebenen Prozess, bei der Teilung von P0 und P1 die Somazellen zunächst anterior, mit Teilung der P2 und P3 jedoch posterior von der Keimbahn zum liegen (Schierenberg, 1987; Schierenberg et al., 1997/98). Inzwischen konnten mit MES-1 und SRC-1 wichtige molekulare Bestandteile dieses Prozesses identifiziert werden (Bei et al., 2002; Berkowitz und Strome, 2000). Eine asymmetrisch auf den Spindelapparat wirkende Zugkraft ist für die asymmetrischen Zellteilungen verantwortlich (Grill et al., 2001; 2003; Grill und Hyman, 2005; Nguyen-Ngoc et al., 2007; Schierenberg, 1987). Eine Übersicht zur Polaritätsbildung und Polaritätsumkehr im frühen Embryo ist in Abb. 3 gegeben. Zellumlagerungen im 4-Zellstadium, aufgrund der Begrenzung der Eischale, definieren die dorso-ventrale Körperachse, mit der Gründerzelle S2 als ventralem Pol. Die anschließenden links-rechts Teilungen der beiden S1-Tochterzellen im 6-Zell Embryo definiert die rechts-links Körperachse.

Der Embryo von *C. elegans* ist bilateralsymmetrisch aufgebaut. Nachkommen der Gründerzellen S2, S3 und S4 ordnen sich rechts und links der Mittellinie an und tragen bilateralsymmetrisch zur Organogenese bei. Im 6-Zell Stadium wird die Symmetrie innerhalb der S1 Nachkommen jedoch durch die anteriore Verlagerung der S1al und S1pl gegenüber ihren rechten Schwesterzellen und deren Nachkommen gebrochen (Deppe et al., 1978). So sind mindestens fünf frühe Induktionen nötig, um die bilaterale Symmetrie der Schicksale innerhalb der Gründerzelle S1 sekundär wiederherzustellen (Schnabel und Priess, 1997). Durch Induktionen werden acht verschiedene AB Schicksale (ara, arp, ala, alp, pra, prp, pla und plp; Abb. 2 und 4g) in den Nachkommen der Gründerzelle S1 determiniert. Es handelt sich hierbei um binäre Entscheidungen, bei deren Ausbleiben sich identische Zellschicksale entwickeln. Diese Induktionen finden in spezifischen Zeitfenstern statt und erfordern distinkte Zell-Zell Kontakte kompetenter Zellen. Die ersten beiden Induktionen bewirken Unterschiede entlang der anterior-posterioren Körperachse, die anderen drei zwischen der rechten und linken Körperhälfte. Die erste Induktion verläuft über den *wnt*-Signalweg, die andern vier über den Notch-Signalweg (Abb. 4; Schnabel und Priess, 1997).

Mit der Einführung der 4D-Mikroskopie (Schnabel et al., 1997) konnte gezeigt werden, dass die Teilungsmuster der Zellen in verschiedenen Embryonen von *C. elegans* räumlich und zeitlich leicht variabel sind, die Zellschicksale des Stammbaums jedoch invariant (Sulston et al., 1983). Darüber hinaus wurde postuliert, dass sich die Nachkommen des 12-Zell Stadiums in distinkte, nicht vermischende, kohärente embryonale Regionen anordnen

(Schnabel et al., 1997). In einer 3D-Rekonstruktion sind die Zellkerne der acht AB-Schicksale eines Embryos von *C. elegans* farblich markiert und deren räumliche „regionale“ Anordnung zueinander dargestellt (Abb. 5). Weitere Analysen führten schließlich zur „cell focusing“ Hypothese, wonach Zellen autonom in Abhängigkeit von ihrem Schicksal Positionswerte besitzen, diese mit ihren Nachbarzellen durch Zell-Zell Interaktionen abzugleichen und sich gemäß ihrer „richtigen Position“ regional zu sortieren (Bischoff und Schnabel, 2006; Schnabel et al., 2006).

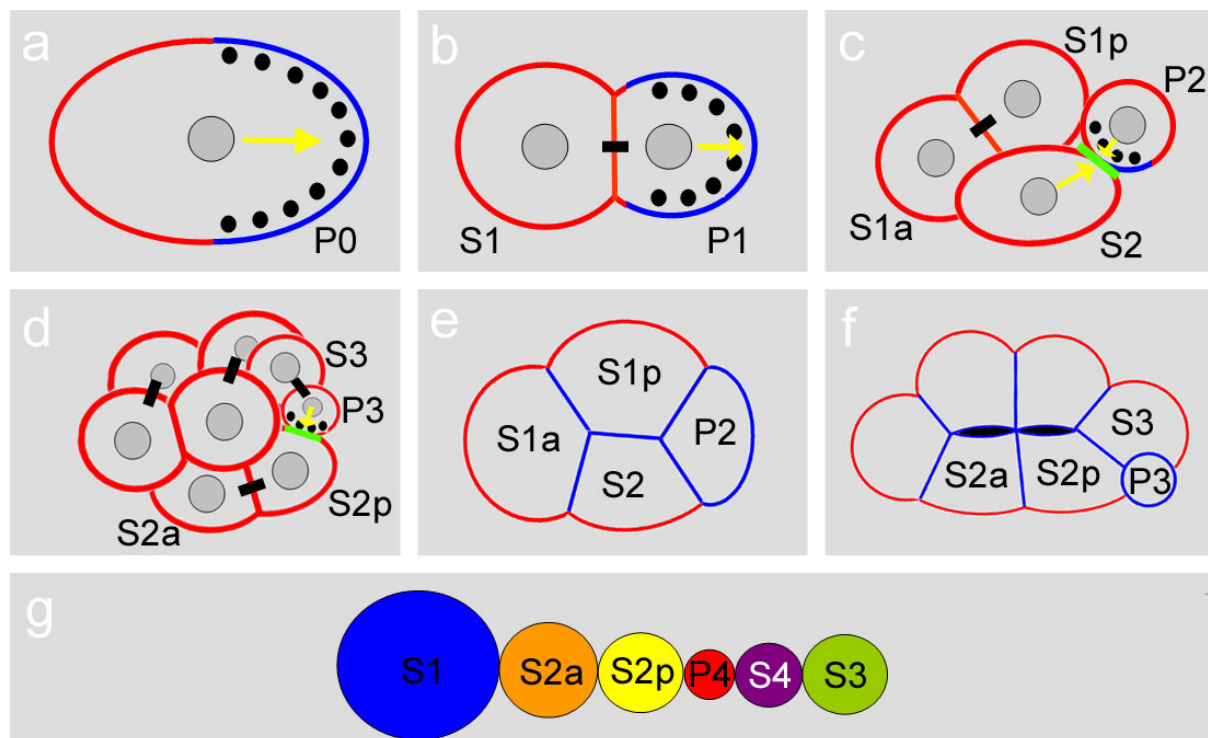


Abb. 3: Polarität und Polaritätsumkehr im frühen Embryo von *C. elegans*

Abb. (a-d) modifiziert nach Gönczy und Rose, (2005), (e-f) nach Nance und Priess, (2004), (g) nach Schierenberg et al., (1997/98). **a-b)** Nach Befruchtung sind PAR-Proteine und P-Granula asymmetrisch verteilt. Asymmetrische Zugkräfte führen zu einer posterioren Verschiebung der Teilungsspindel und anschließender asymmetrischer Teilung. **b-c)** PAR-Proteine sind, P-Granula werden in P1 asymmetrisch verteilt. Asymmetrische Zugkräfte auf die Teilungsspindel führen zu asymmetrischen Teilung. **c)** MES-1/SRC-1 polarisiert EMS und P2, asymmetrische Zugkräfte auf die Teilungsspindel, hin zur MES-1 Lokalisation, führen zu asymmetrischen Zellteilungen und asymmetrischer P-Granula Verteilung. **d)** Asymmetrische Zugkräfte auf die Teilungsspindel, hin zur MES-1 Lokalisation, führen zu asymmetrischen Zellteilungen und asymmetrischer P-Granula Verteilung. **e-f)** Mit dem späten 4-Zell Stadium kommt es zu einer apicobasalen Verteilung der PAR-Proteine in den somatischen Gründerzellen und ein kleines Blastocoel wird gebildet. **g)** In einer Reihe von anterior-posterioren Teilungen der P1-P3 entstehen die somatischen Gründerzellen zunächst anterior von der Keimbahn, mit Teilung der P2 kommen diese jedoch posterior von der Keimbahn zum liegen. **rot:** PKC-3/PAR-3/PAR-6, **grün:** MES-1/SRC-1, **blau:** PAR-1/PAR-2, **schwarze Kugeln:** P-Granula, **gelber Pfeil:** asymmetrische Spindelausrichtung, **schwarze Fläche:** Blastocoel. **Orientierung:** anterior links, linke Lateralansicht.

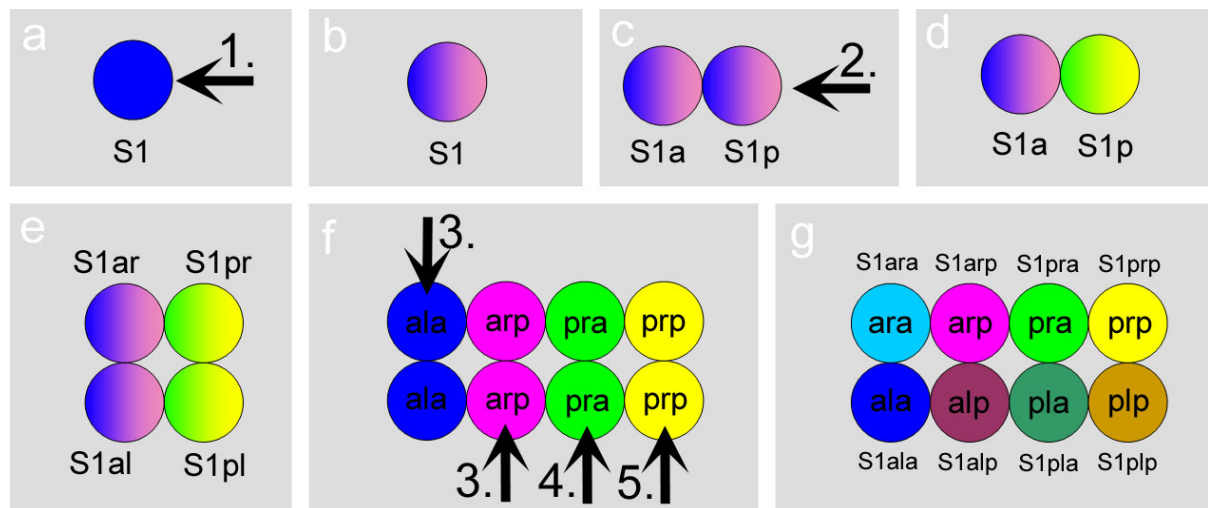


Abb. 4: Frühe Induktionen definieren das AB Schicksal der Gründerzelle S1 in *C. elegans*

Modifiziert nach Schnabel und Priess, (1997). **a+b)** Erste polarisierende Induktion im 2-Zell Stadium, P1 induziert über *mom-2* / *mom-5* den posterioren Part von S1 (AB). **c+d)** Nach ursprünglicher links-rechts Teilung kommen die Tochterzellen der AB in anterior-posteriorer Lage zum liegen. Zweite Induktion im 4-Zell Stadium, P2 induziert über *apx-1* und *glp-1* die posteriore der AB Tochterzellen. **e+f)** Durch links-rechts Teilung entstehen vier AB Zellen, welche noch durch die erste Induktion polarisiert sind. Hierdurch entstehen in der folgenden anterior-posterioren Teilung acht AB Zellen mit vier Schicksalen. **f+g)** Dritte Induktion im 12-Zell Stadium, MS induziert über nicht spezifizierten Ligand und *glp-1* in den angrenzenden kompetenten Zellen die Schicksale ABara und ABalp. Vierte Induktion im 24-Zell Stadium, ABalarp induziert über Ligand und *glp-1* das Schicksal ABpla. Fünfte Induktion im 26-Zell Stadium, MSap induziert über Ligand und *glp-1* das Schicksal in ABplp. **g)** Unterbleiben eine oder mehrere dieser fünf Induktionen, kommt es zu massiven Schicksalstransformationen und im Extremfall tritt nur das Schicksal ABala auf.

Die Gastrulation von *C. elegans* (Abb. 6) wird als typisch für das gesamte Taxon Nematoda angesehen. Der Embryo ist mit einer Vitellinmembran, welche wiederum von einer Eischale umhüllt ist, umgeben. Dies führt dazu, dass alle morphologischen Prozesse ohne eine Zunahme der Zellmasse von statten gehen müssen. Darüber hinaus sind diese Prozesse nicht nur durch Zell-Zell Kontakte, sondern auch durch die räumlichen Beschränkungen dieser Ummantelung beeinflusst. *C. elegans* bildet während der ersten Zellteilungen kein Blastocoel aus, sondern nur kleine flüssigkeitsgefüllte Hohlräume (Abb. 6f, g), deren Gesamtvolumen nur etwa 50% einer einwandernden Darmvorläuferzelle beträgt (Nance und Priess, 2002; 2004). Nichtsdestotrotz könnte ein 8-Zell Embryo als einlagige Blastula mit rudimentärem Blastocoel angesehen werden, in welchem die korrekte apikobasale Verteilung der PAR-Proteine für eine asymmetrische Zelladhäsion nötig ist (Abb. 3f; Nance et al., 2003; Nance und Priess, 2004; Reese et al., 2000). Die Gastrulation beginnt mit der Einwanderung von zwei Darmvorläuferzellen (Abb. 6e, f) gefolgt von der Keimbahn (Abb. 6e-g) und mesodermalen Zellen. Dabei wandern alle Zellen von der ventralen Körperseite in einem Zeitraum von etwa 200 Minuten ein (Abb. 6h-j; Nance und Priess, 2002; 2004).

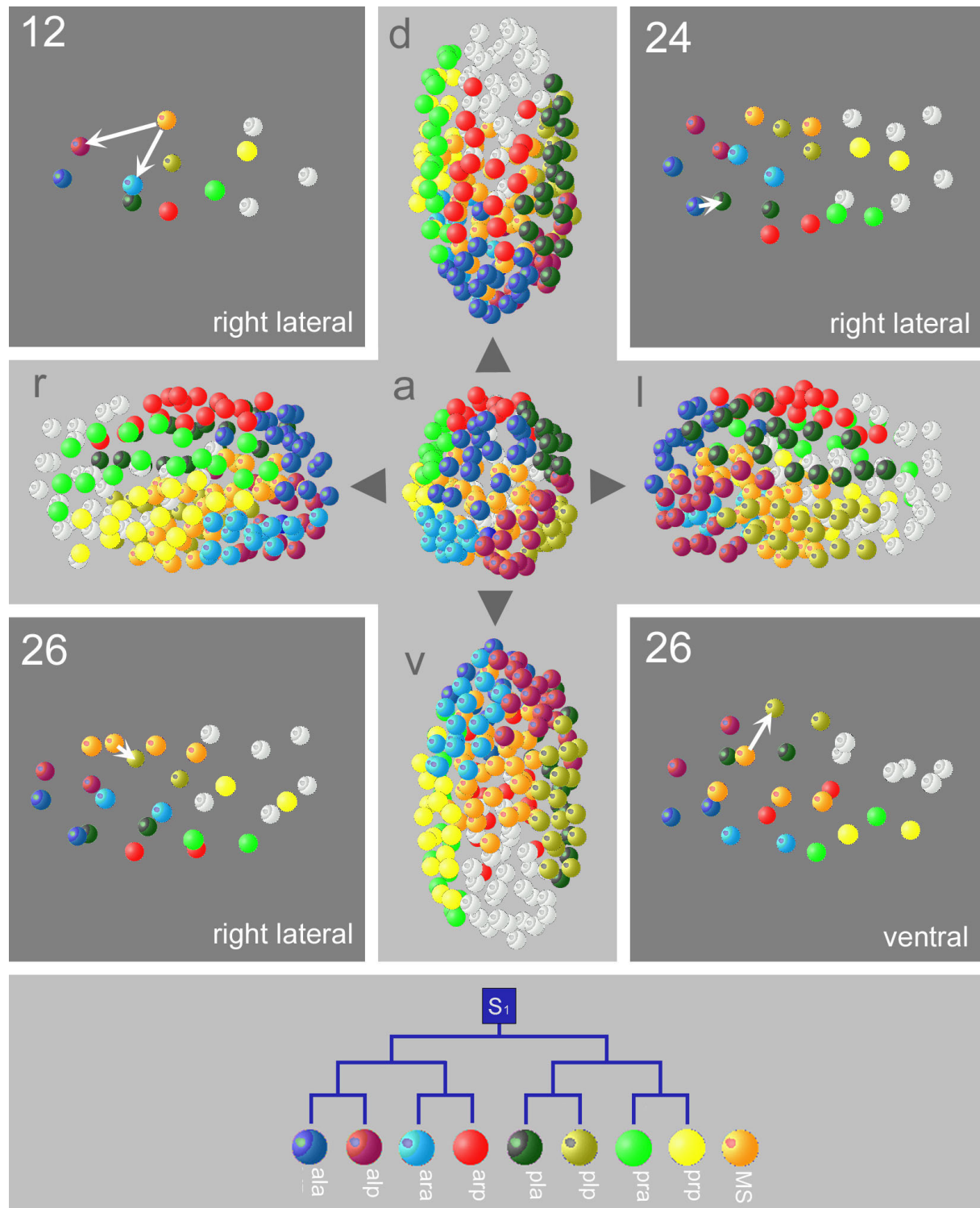


Abb. 5: Zellgruppierung der S1 Nachkommen von *C. elegans*

Mit SIMI®-BIOCELL® rekonstruierte 3D-Kugelmodelle der Zellkernpositionen unterschiedlicher Embryonalstadien von *C. elegans*. Arrangement der Zellkerne zeigt für Zell-Zell Induktionen nötige Zellkontakte (weiße Pfeile). Im 12-Zell Stadium berührt S2a (MS) die S1 Nachkommen S1alp und S1ara und induziert die Schicksale ABalp und ABara (3. Induktion; s. Abb. 3f). Im 24-Zell Stadium berührt S1alap die Zelle S1plaa und induziert das Schicksal ABpla (4. Induktion). Im 26-Zell Stadium berührt S2ap (MS) S1plpa und induziert das Schicksal ABplpa (5. Induktion). Nachkommen der acht AB-Schicksale gruppieren sich in Regionen. Orientierung des 12, 24 und 26 Zellstadiums: anterior links. Orientierung des 128 S1-Stadiums: a) anteriore Ansicht, Drehung um 90° resultiert in einer (r) rechten, (l) linken, (d) dorsalen beziehungsweise (v) ventralen Ansicht des Kugelmodells, deren anteriore Pole zur Mitte ausgerichtet sind.

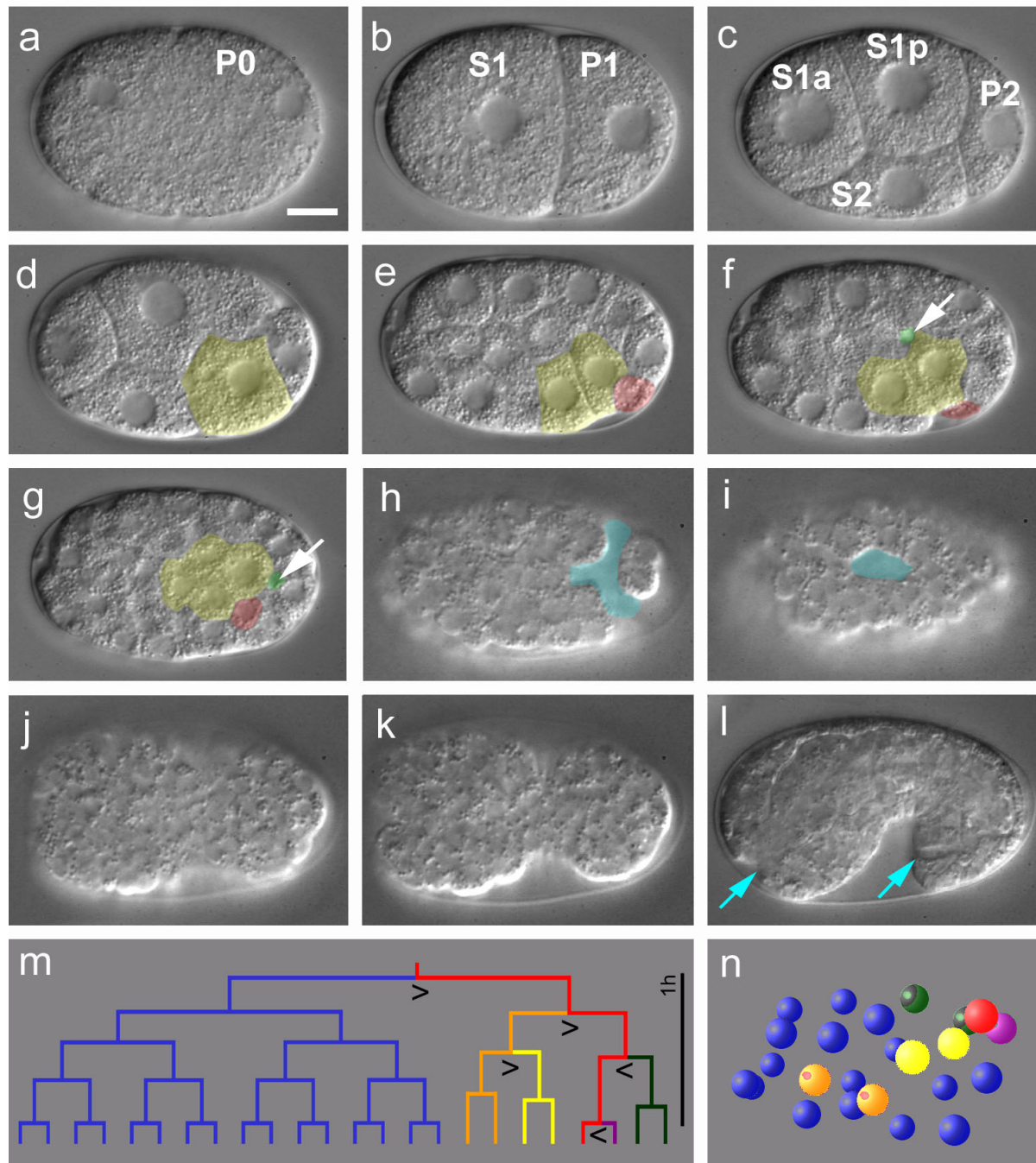


Abb. 6: Musterbildung, Polaritätsumkehr und Gastrulation von *C. elegans*

a-b) Vorkernstadium, P0 teilt sich longitudinal asymmetrisch. **b-c)** P1 teilt sich longitudinal asymmetrisch, S1 transvers symmetrisch, es entsteht ein rhombusförmiges 4-Zell Stadium. **d)** Die Darmvorläuferzelle S2p (gelb) markiert den ventralen Pol. **e-g, n)** Gastrulationsbeginn, zwei Darmzellen gefolgt von P4 beginnen einzuwandern. Kein Blastocoel, nur einige kleinere flüssigkeitsgefüllte Hohlräume (hellgrün, weiße Pfeile). **h-i)** Durch den sich formenden Blastoporus (türkis) wandern Nachkommen der Gründerzellen S2, S3 und S4 ein. **j-k)** Durch Epibolie wird der Blastoporus überwachsen. **l)** Mund- und Anusöffnung entstehen durch einen neuen sekundären Durchbruch (hellblaue Pfeile). **m)** In einer Reihe von stammzellähnlichen asymmetrischen Zellteilungen entstehen die Gründerzellen S1 (blau), S2 (orange), S3 (dunkelgrün), S4 (lila) und P4 (rot) entlang der anterior-posterioren Körperachse. Polaritätsumkehr in P2, Zellzykluslängen und asymmetrische Zelleilungen (<>) sind eingezeichnet. **n)** 3D Kugelmodell des in e) dargestellten Embryos, die Nachkommen von S1 definieren die links-rechts Körperachse und sind gegeneinander verschoben. **Orientierung:** anterior links, a-g, l) linke Lateralansicht, h-k, n) Ventralansicht. **Eichstrich** 10µm.

Epidermale Zellen, welche ausschließlich auf der dorsalen Körperhälfte des Embryos liegen, beginnen sich über die ventrale Seite des Embryos auszubreiten und selbige zu schließen (Epibolie, Abb. 6j, k; Simske und Hardin, 2001; Sulston et al., 1983).

Bei *C. elegans* handelt es sich zwar um einen Vertreter der Protostomier (Urmünder), interessanterweise beginnt der Blastoporus sich jedoch im posterioren Bereich des Embryos auszubilden (Abb. 6h, i), schließt sich durch Epibolie (Abb. 6j, k) und Mund und Anus werden jeweils durch neue sekundäre Durchbrüche geschaffen (Abb. 6l). Hierbei handelt es sich jedoch lediglich um Modifikationen des „klassischen“ Protostomiers (Fioroni, 1987).

Die Organogenese von *C. elegans* kann als polyklonal beschrieben werden. Seine Organe werden, abgesehen vom Darm, polyklonal von Zellen unterschiedlicher Stammbaumzweige gebildet. Darüber hinaus liefern die meisten Stammbaumzweige polyklonal Beiträge zu verschiedenen Geweben, lediglich die Stammbaumzweige S1ala (Nervenzellen), S4 (Körpermuskel) und S2p (Darm) sind monoklonal aufgebaut (Abb. 2).

Bahnbrechende Erkenntnisse im Bereich des programmierten Zelltodes und der RNA-Interferenz sind an *C. elegans* erforscht worden. So haben Brenner, Horvitz und Sulston 2002 den Nobelpreis für ihre Arbeiten zur „genetic regulation of organ development and programmed cell death“ erhalten. 2006 haben Fire und Mello den Nobelpreis für ihre Entdeckung der „RNA interference - silencing by double-stranded RNA“ erhalten.

1.2 Ziele der Arbeit

Die Untersuchung der Embryonalentwicklung, als Teil der Ontogenese, einer einzigen Spezies wie *Caenorhabditis elegans* (Clade 9) erlaubt keine Aussage über die Entwicklungsmuster oder die Phylogenese des Taxons Nematoda. Die bereits in der Einleitung beschriebene Variabilität und Vielfalt in der Embryonalentwicklung zeigen, dass *C. elegans* nicht als allgemeingültiges Referenzsystem der Nematoda angesehen werden kann. Um die Evolution der Entwicklung innerhalb der Nematoda zu verstehen und auf diesem Gebiet durch Vergleich eine Aussage über plesiomorphe und apomorphe Merkmale treffen zu können, so wie es auf morphologischer Ebene mit großem Erfolg möglich war und noch ist, müssen ausreichend repräsentative Vertreter dieses Taxons, vor dem Hintergrund eines soliden phylogenetischen Stammbaumes, für eine Untersuchung zur Verfügung stehen. Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Suche nach repräsentativen Vertretern innerhalb der schlecht untersuchten Enoplea (Claden 1 und 2), deren Etablierung im Labor und darauf aufbauend die Analyse der Embryonalentwicklung und Erstellung von Zellstammbäumen. Darüber hinaus werden weitere, ausgewählte Vertreter der Nematoden auf spezifische Fragestellungen hin untersucht, um damit bestehende Kenntnis- und Verständnislücken in der Entwicklungsbiologie der Nematoden zu schließen. Hierzu gehören insbesondere die folgenden Aspekte:

- Keimbahn-Soma Trennung
- Polaritätsumkehr in der Keimbahn als musterbildender Prozess
- Determination der Körperachsen
- Variationen in der frühen Musterbildung
- Zeitliche Variationen in der Zellteilungsabfolge und Zellzykluslänge
- Variationen von Zell-Zell Kontakten, die für potentielle Induktionen bedeutsam sein könnten
- Organogenese
- Blastulabildung und Gastrulation
- Schicksalsfestlegung und Regulation
- Invarianz von Zellstammbäumen

Diese Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis der Evolution von entwicklungsbiologischen Prozessen innerhalb der Nematoda liefern und prüfen, inwieweit entwicklungsbiologische Daten als phylogenetische Marker herangezogen werden können. Letzteres würde die erstmalige Möglichkeit bieten, die gewonnenen Erkenntnisse mit den beschriebenen Befunden von Tardigraden und Rotatorien in Bezug zu setzen und so möglicherweise eine embryologische Unterstützung der Ecdysozoa-Hypothese zu liefern.

2. Phylogenie

Der Botaniker Carl von Linné führte die bis heute übliche binäre Nomenklatur aus Gattungsnamen und Epitheton ein und katalogisierte in seinen „Systema Naturae“ (von Linné, 1767) etwa 12.000 Tier- und Pflanzenarten nach physischen Eigenschaften. Seine Suche nach der natürlichen Ordnung ebnete den Weg für die Erkenntnisse von Charles Darwin und legte den Grundstein für die moderne Taxonomie. Ernst Haeckel stellte mit seinem „Monophyletischen Stammbaum der Organismen“ (Haeckel, 1866) sein erstes Baumdiagramm vor, in dem die Pflanzen, Protisten und Tiere auf einen gemeinsamen Ursprung zurückgeführt werden. Schließlich begründete Willi Hennig mit seinen „Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik“ (Hennig, 1950) die Kladistik. Seit einigen Jahren basieren moderne phylogenetische Stammbäume auf computeranalysierten genetischen Daten.

Ihre Omnipräsenz rückte die Nematoda seit über zwei Jahrhunderten ins Visier von Forschern und ihre Artenvielfalt forderte früh eine strikte Systematik. Dabei beruht die klassische phylogenetische Einordnung auf morphologischen Kriterien und ist stark durch die Qualität der optischen Instrumente begrenzt. Dies macht ihre Bestimmung selbst für Spezialisten zum Teil schwierig. Die moderne Einordnung beruht auf computergestützten Analysen von SSU rDNA Sequenzen mittels unterschiedlicher mathematischer Ansätze (Hansen, 2004) zur Erstellung phylogenetischer Stammbäume. Klassische und moderne phylogenetische Einordnungen haben Vor- und Nachteile, durch Kombination können die Stärken beider synergistisch genutzt werden (De Ley und Blaxter, 2002).

In der letzten Dekade ist die Einteilung des Tierreiches und die phylogenetische Zuordnung der Nematoda in verschiedenen Publikationen kontrovers nach morphologischen und molekularbiologischen Gesichtspunkten diskutiert worden. Die Anhänger der Articulata-Hypothese (Hyman, 1940; Meglitsch und Schram, 1991; Nielsen, 2001) teilen das Tierreich nach morphologischen Kriterien in Acoelomata, Pseudocoelomata und Eucoelomata, wobei die segmentierten Panarthropoda aus den segmentierten Annelida hervorgehen (Abb. 7A). Die Anhänger der Ecdysozoa-Hypothese (Adoutte et al., 2000; Aguinaldo et al., 1997; Philippe et al., 2005) teilen das Tierreich in Ecdysozoa, Lophotrochozoa und Deuterostomia ein. Diese Daten werden teilweise auch morphologisch unterstützt, da sich die Ecdysozoa unter anderem durch Häutung, innere Befruchtung und fehlende Cilien auszeichnen. Allerdings müsste die Segmentierung der Annelida und Panarthropoda unabhängig voneinander entstanden sein (Abb. 7B). Einen Kompromissvorschlag, der die Stärken beider Hypothesen in einem phylogenetischen Stammbaum zu vereinigen versucht, wurde von Nielsen (2003) vorgeschlagen. Die Ecdysozoa gehen dabei aus den segmentierten Annelida hervor, womit die ähnlichen Baupläne der Annelida und Panarthropoda erklärt werden

können. Allerdings setzt dieser Kompromiss voraus, dass Teile der Ecdysozoa einen ursprünglich segmentierten Körperbau verloren haben und die Pseudocoelomata aus den Eucoelomata hervorgegangen sind (Abb. 7C).

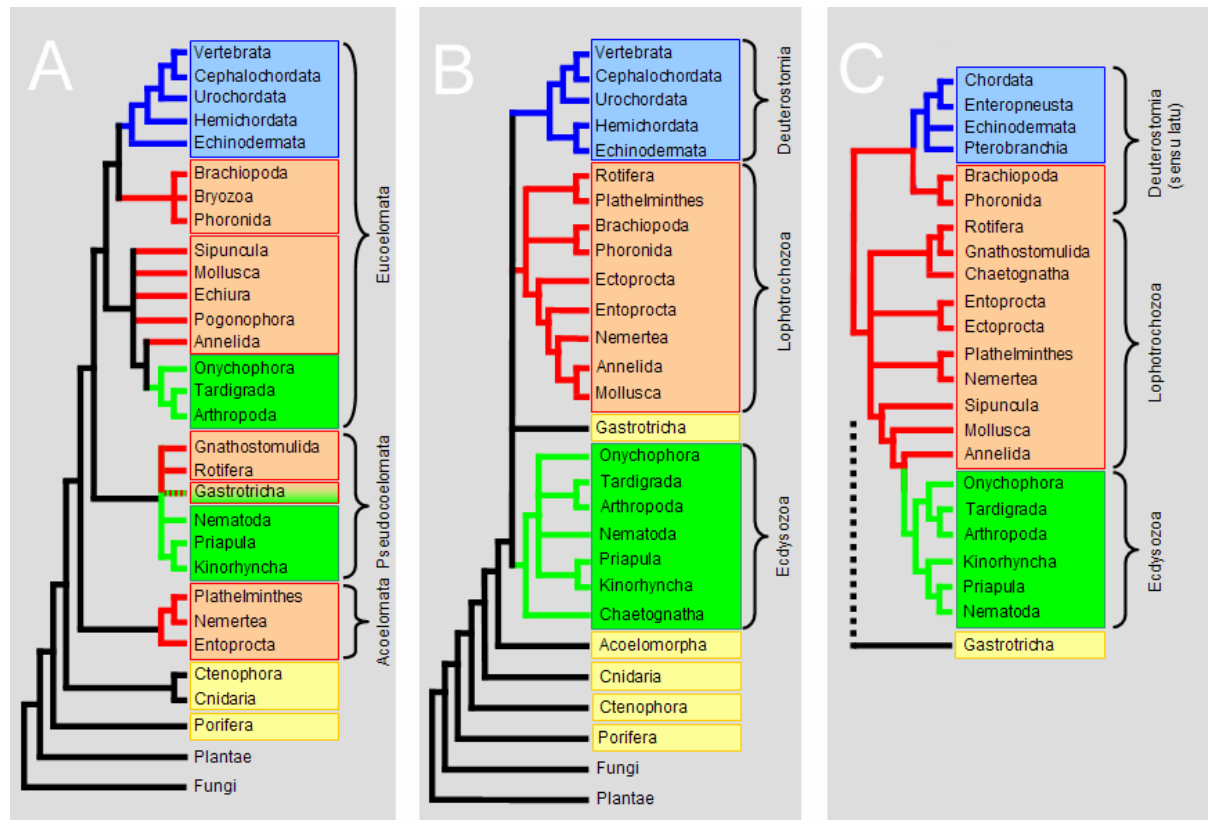


Abb. 7: Unterschiedliche phylogenetische Einordnungen der Nematoda

A) Nach morphologischen Kriterien erstellter phylogenetischer Stammbaum des Tierreiches (modifiziert nach Adoutte et al., 2000; Hyman, 1940). **B)** Ein nach SSU rDNA und Hoxgenanalyse erstellter phylogenetischer Stammbaum des Tierreiches (modifiziert nach Adoutte et al., 2000). **C)** Kompromissvorschlag unter Berücksichtigung morphologischer und molekularer Daten (modifiziert nach Nielsen, 2003).

Die Fadenwürmer wurden ursprünglich als Ordnung Nematodea (Rudolphi, 1808) beschrieben, unter der Bezeichnung Nemata (Cobb, 1919) erstmals als Stamm eingeordnet und später als Nematoda (Chitwood, 1957; 1958) geführt. Abhängig vom Vorkommen so genannter Phasmiden (Chemorezeptoren) wurden die Nematoda in die Unterstämme Aphasmidia (später Adenophorea) und Phasmidia (später Secernentea) unterteilt (Chitwood, 1937; 1958; Chitwood und Chitwood, 1933). Neuere Publikationen teilen die Nematoden in die Unterstämme Enoplea und Chromadorea auf (De Ley und Blaxter, 2002; Meldal et al., 2007). Selbige Autoren unterteilen die Enoplea in die Klassen Enoplia und Dorylaimia und die Chromadorea in die Klasse der Chromadorea. Abweichend hierzu unterteilen andere Autoren, unter Berücksichtigung morphologischer sowie embryonaler Eigenschaften, die Chromadorea in die paraphyletische Klasse Chromadorea und die monophyletische Klasse

Rhabditia, wobei letztere die ehemaligen Secernentea umfasst (Lorenzen, 1994; Malakhov, 1994; Schierenberg, 2006; Schierenberg und Lahl, 2004).

Neue SSU rDNA Analysen zeigen, dass es sich bei den Nematoda um ein monophyletisches Taxon handelt, welches sich in 12 Claden und einen unaufgelösten Ast unterteilen lässt (Abb. 8; Holterman et al., 2006), welche zu großen Teilen mit einer fast zeitgleich erschienenen Analyse (Meldal et al., 2007) deckungsgleich sind.

Die Verwandtschaftsverhältnisse der in dieser Arbeit verwendeten und beschriebenen Nematoden sind in einem einfachen phylogenetischen Stammbaum dargestellt (Abb. 8).

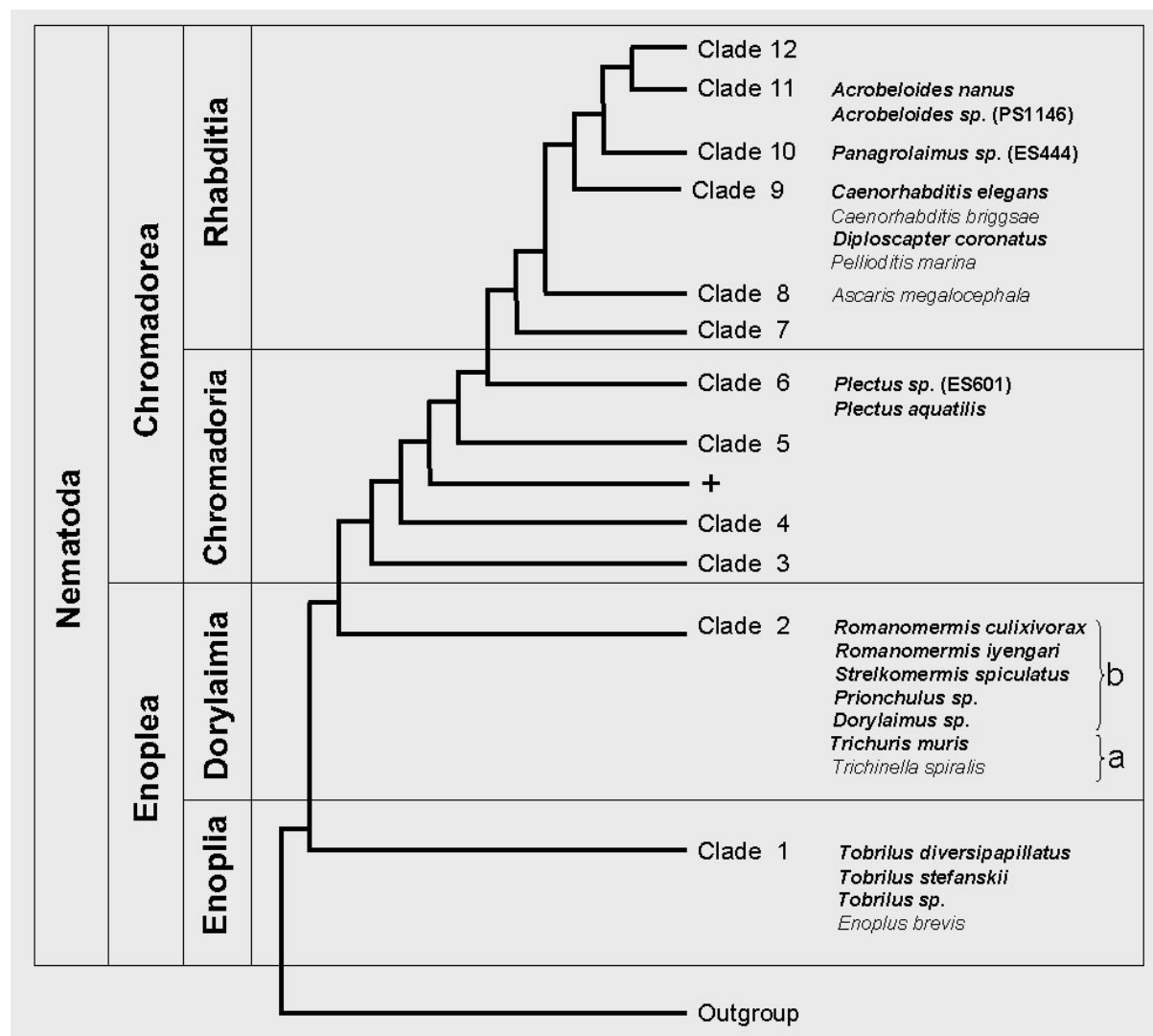


Abb. 8: Phylogenetische Einordnung der in dieser Arbeit beschriebenen Nematoda

Nach Holterman et al. (2006) modifizierter, auf SSU rDNA Sequenzanalyse basierender phylogenetischer Stammbaum. Die Nematoda werden in 12 monophyletische Claden und einen unaufgelösten Zweig (+) eingeteilt. Die in dieser Arbeit untersuchten (**fett geschrieben**) oder erwähnten (*kursiv geschrieben*) Arten bzw. Gattungen sind eingetragen. Die Unterteilung des Clades 2 beruht auf den in dieser Arbeit dargestellten embryologischen Befunden (Kapitel 4.4.4.).

3. Material und Methoden

Binokular	M8	Wild-Heerbrugg (BRD)
Brutschrank	BD 53	Binder (BRD)
Heizblock	BBA 1	Grant Instruments (UK)
Farbstofflaser		Laser Science Inc. (USA)
Feinwaage	PB303-S	Mettler (BRD)
Gefriersubstitutionsautomat	EM AFS	Leica MS (A)
Hochdruckgefrierer	EMPACT2 + RTS	Leica MS (A)
Magnetrührer	Ikamag RET	IKA Labortechnik (BRD)
Mikroskopie	Leica DMLB C-Plan 10x/0,22 N-Plan 20x/0,4 PL Fluotar 40x/1,0-0,5 Oil PL Fluotar 100x/1,3-0,6 Oil Okular L-Plan 10x/25	Leica (BRD)
	Axioskop2 mot plus A-Plan 5x/0,12 A-Plan 10x/0,25 Plan-Neofluar 40x/0,75 Plan-Neofluar 100x/ 1,3-0,7 Oil Okular PI 10x/23	Zeiss (BRD)
Fluoreszenzfilter	Filtersatz 01 BP 365/12 FT 395 LP 397 Filtersatz 09 BP 450-490 FT 510 LP 515 Filtersatz 20 BP 546/12 FT 560 BP 575-640	
Optovare	0,50x Optovar 0,63x Optovar 1,00x Optovar	Leica (BRD)
Öl	Immersol 518N	Zeiss (BRD)
4D-Mikroskopsteuerung	C++ (by A.-K. Schulz)	Labor Ralf Schnabel
Kompression	LuraWAVE	Luratech (BRD)
Mikroskopkamera	VC 45	PCO (BRD)
Framegrabber	Inspecta 2	Mikroton (BRD)
Pipetten	P2, P20, P200, P1000	Gilson (USA)
Pipettus	Accu-Jet	Brand (BRD)
pH-Meter	HI 9025	Hanna Instruments (BRD)
TEM	TECNAI 12	FEI (NL)
Ultramikrotom	UCT	Leica (BRD)
Videocameras	AxioCam MRc BC 12	Zeiss (BRD) AVT Horn (BRD)
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Industries (USA)
Wasserbad	WB 7	Memmert (BRD)
Waage	PE300	Mettler (BRD)
Zentrifugen	Z300 5415C	Hermle (BRD) Eppendorf (BRD)

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte, Modellbezeichnungen und Hersteller

Die in der Arbeit verwendeten Geräte wurden von den angegebenen Firmen bezogen.

Chemikalien

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Roth (BRD), Sigma (BRD), Gibco BRL (BRD) und AppliChem (BRD) bezogen.

Verbrauchsmaterialien

Die in der Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Roth (BRD), VWR (BRD) und Renner (BRD) bezogen.

3.1 Nematoden

Art	Code	Bezugsquelle	(*)	Literatur
<i>Acrobeloides nanus</i>	ES 501	E. Schierenberg	1	(Skiba und Schierenberg, 1992)
<i>Acrobeloides sp. „herma-1“</i>	PS 1146	Paul Sternberg	1	(Sadler, 2000)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	N2	Sydney Brenner	1	(Brenner, 1974)
<i>Diploscapter coronatus</i>	PDL 0010	Paul De Ley	1	(Zell, 1993)
<i>Dorylaimus sp.</i>	-	E. Schierenberg	3	(Malakhov, 1994)
<i>Enoplus sp.</i>	-	Jens Schulze	4	(Voronov und Panchin, 1998)
<i>Prionchulus sp.</i>	-	Jens Schulze	3	(Malakhov, 1994)
<i>Panagrolaimus sp.</i>	ES 444	E. Schierenberg	2	-
<i>Plectus sp.</i>	ES 601	E. Schierenberg	2	(Lahl et al., 2003)
<i>Romanomermis culicivorax</i>	-	Edward Platzer	5	(Petersen et al., 1978)
<i>Romanomermis iyengari</i>	-	Edward Platzer	5	(Perez Pacheco et al., 2005)
<i>Strelkomermis spiculatus</i>	-	Edward Platzer	5	(Poinar und Camino, 1986)
<i>Tobrilus stefanskii</i>	-	Jens Schulze	3	-
<i>Tobrilus sp.</i>	-	Jens Schulze	3	-
<i>Trichuris muris</i>	-	Heinz Mehlhorn	6	(Malakhov, 1994)

Tabelle 2: Zucht der verwendeten Nematodenstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten oder beschriebenen Nematoden wurden nach unterschiedlichen Methoden isoliert und gezüchtet, bzw. können unter Laborbedingungen bisher nicht gehalten werden. Bezugs- und Literaturquellen sowie Zuchtbedingungen (*) sind angegeben. (1) Zucht auf salzhaltigen Agarplatten, (2) Zucht auf salzfreien Agarplatten, (3) Isolation aus Bodenproben, (4) Isolation aus Salzbodenproben, (5) Zucht mit Mückenkulturen, (6) Zucht in kollaborierenden Laboren.

3.2 Nematodenisolierung und Bestimmung

3.2.1 Isolation von Nematoden aus Bodenproben

Bodenproben werden bis zu einer Tiefe von etwa 10 cm entnommen und maximal eine Woche bis zur Verarbeitung dunkel und verschlossen gelagert. Die Extraktion der Nematoden erfolgt mittels einer nach Hopper (1990) modifizierten Vorrichtung. Hierfür wird ein einlagiges Küchenpapier (als Gaze) in ein Sieb gelegt, befeuchtet und etwa 1 kg Bodenprobe eingefüllt. Dieses wird in eine Schale mit Leitungswasser gestellt, so dass sich die Probe etwa zur Hälfte unter der Wasseroberfläche befindet. Die Nematoden gelangen entlang des Feuchtigkeitsgradienten in die Schale und wurden nach etwa 12 h durch eine 45 µm Gaze aufkonzentriert.

3.2.2 Isolation von Nematoden aus Salzbodenproben

Salzwiesenbodenproben wurden freundlicherweise vom Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung zur Verfügung gestellt. Sie können mehrere Wochen bis zur Verarbeitung dunkel und verschlossen gelagert werden. Die Extraktion der Nematoden erfolgt mittels „simulierter Klimaverschlechterung“. Hierfür wird mit einem zylindrischen Gefäß eine etwa 3 cm hohe Bodenprobe ausgestochen, mit 3 cm grobem Sand überschichtet und mit 2 % (w/v) Salzwasser bedeckt. Nach 2-3 Tagen dunkler Lagerung bei 23°C ist der Sauerstoff in der Probe verbraucht, eine vom Gefäßboden aufsteigende schwarze Verfärbung wird sichtbar und die Nematoden wandern in die Sandschicht ein. Der Sand wird viermal mit 2 % (w/v) Salzwasser aufgeschwemmt und sofort nach dessen Absetzen über einer 45 µm Gaze dekantiert. Der Rückstand in der Gaze wird in Petrischalen gespült und die aufkonzentrierten Nematoden werden in 2 % (w/v) Salzwasser gehalten.

3.2.3 Isolation parasitärer Nematoden

Die beschriebenen parasitären Nematoden *T. muris* und *T. spiralis* wurden nicht in unserem Labor gezüchtet, sondern freundlicherweise von Prof. Dr. Mehlhorn der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und der Bayer AG (Leverkusen) zur Verfügung gestellt.

3.2.4 Bestimmung isolierter Nematoden

Zur Bestimmung von Nematoden nach Bongers (1994) werden die isolierten Nematoden einige Minuten in 0,3% NaAz inkubiert, auf Agarose-Objektträger (siehe 3.5.3) übertragen und lichtmikroskopisch untersucht. Eine solche Behandlung ist zumeist reversibel und die Nematoden erholen sich in NaAz freiem Medium. Alternativ kann die lichtmikroskopische Untersuchung auch auf Agarose-Objektträgern mit gequetschten Präparaten durchgeführt werden.

3.3 Zucht von Bodennematoden

Rhabditiden und Cephalobiden werden auf mit *E. coli* (OP50) beimpften salzhaltigen, Plectiden auf mit *E. coli* (OP50) beimpften salzfreien Agarplatten gezüchtet. Die Platten werden mit Parafilm verschlossen bei 16°C für mehrere Wochen gelagert. Von einer gut bewachsenen Ursprungsplatte werden mit einem ausgeglühten Skalpell kleine Agarstücke ausgeschnitten und auf neue mit *E. coli* (OP50) beimpfte Platten übertragen. Eine schnellere Entwicklung der Nematoden kann durch Kultivierung bei 25°C erreicht werden.

3.3.1 *E. coli* als Futterquelle

Bei dem für die Nematoden zucht verwendeten *E. coli* Stamm handelt es sich um eine Uracil auxotrophe Mutante (OP50), welche auf den verwendeten uracilfreien Agarplatten nur einen dünnen Bakterienrasen ausbilden kann.

150 ml Anzuchtmedium werden mit einer Einzelkolonie von OP50 angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37°C kultiviert. Der salzhaltige oder -freie Agar wird in sterile Petrischalen gegossen und nach dem Erkalten mit OP50 beimpft. Nach etwa 24 h Inkubation bei Raumtemperatur ist der Bakterienrasen gewachsen und die Platten können mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden.

3.3.2 Kryokonservierung von *E. coli*

5 ml LB werden mit einer Einzelkolonie von *E. coli* OP50 angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 600 µl der Bakteriensuspension werden 1:1 mit wasserfreiem Glycerin in einem Kryokulturröhrchen gemischt, katalogisiert und bei -80°C gelagert. Um die Kryokultur zu reaktivieren, wird Material mit einer sterilen Impföse auf LB-Agarplatten ausgestrichen.

3.3.3 Kryokonservierung von Bodennematoden

Nematoden werden bei 16°C gezüchtet, bis der Bakterienrasen verbraucht ist und nur noch L1 und L2 Larvenstadien vorhanden sind. Mehrere Platten werden mit insgesamt 3 ml Einfriermix abgespült, dieser auf vier Kryokulturröhrchen verteilt, katalogisiert und in flüssigem Stickstoff eingelagert. Am nächsten Tag wird als Kontrolle die Überlebensrate eines der vier Kulturröhrchen abgeschätzt. Um die Kryokultur zu reaktivieren wird sie aufgetaut und auf einer mit *E. coli* (OP50) beimpften Agarplatte bei 16°C inkubiert. Die Lagerung ist über Jahrzehnte möglich, sofern die Kulturen niemals aufgetaut werden. Leider eignet sich diese Methode fast ausschließlich für Rhabditiden.

3.3.4 Reinigung von verunreinigten Nematodenkulturen

Bei der Kultur von Nematoden kommt es immer wieder zu Kontaminationen mit unerwünschten Bakterien und Pilzen. Diese sind zum Teil für die Kultur selbst als auch für mikroskopische Aufnahmen lästig, schädlich oder toxisch. Um diesem Problem Herr zu werden, werden kontaminierte Platten mit ddH₂O abgespült und Eier (und Würmer) in 15 ml Falcontubes gesammelt und pelletiert. Das Pellet wird in 12 ml Hypochloritlösung 2-5 min stark geschüttelt, bis sich die Eischale fast aufgelöst hat, und anschließend dreimal mit 12 ml sterilem ddH₂O gewaschen. Die gereinigten Eier werden in einer kleinen Menge sterilem ddH₂O auf mit *E. coli* (OP50) beimpfte Platten transferiert.

3.4 Zucht von *Romanomermis culicivorax*

Bei *R. culicivorax* handelt es sich um einen Parasiten mit breitem Wirtsspektrum innerhalb der *Culicidae*. Die für die Zucht verwendeten Eier der Stechmücke *Aedes aegypti* wurden freundlicherweise von der Bayer AG (Leverkusen) zur Verfügung gestellt.

Eier von *A. aegypti* werden im Dunkeln bei 23°C in ddH₂O eingebracht, aber erst 24-48 h nach dem Schlüpfen mit Fischfutter gefüttert, um eine synchrone Kultur zu erhalten. Nach der ersten Häutung werden die Mückenlarven in flachen mit ddH₂O gefüllten Petrischalen mit dem fünffachen an *R. culicivorax* L2 Larven zur Infektion versetzt. Hierfür werden etwa vier Stunden vor der Infektion 2-3 gehäufte Teelöffel Kies aus der *R. culicivorax* Dauerkultur in eine Schüssel mit ddH₂O gegeben und der Larven-Titer bestimmt. Während der Infektionsphase werden die Mückenlarven 12-24 h nicht gefüttert. Nach weiteren sechs Tagen regelmäßiger Fütterung werden die infizierten Mückenlarven in ein Gefäß mit einer engmaschigen Gaze als doppeltem Boden umgefüllt. Die Gaze dient während der nächsten sieben Tage zur Separation der nicht infizierten Mückenlarven von den „geschlüpfen“ *R. culicivorax*. Letztere werden in mehreren Waschschritten mit sterilem ddH₂O von Futterresten und Kontaminationen gereinigt.

3.4.1 Dauerkultur von *R. culicivora*x

500 g mit sterilem Leitungswasser befeuchteter grober autoklavierter Kies wird in eine geschlossene Plastikdose mit etwa 2000 adulten *R. culicivora*x gegeben. Die Nematoden legen ihre Eier innerhalb der nächsten Wochen im Kies ab. Bevor die Dauerkultur für die Neuinfektion von Mückenlarven eingesetzt werden kann, muss sie zwei Monate bei 20°C ruhen und ist fest verschlossen bei 20°C gelagert für mindestens ein halbes Jahr haltbar.

3.4.2 Arbeitskultur von *R. culicivora*x

Die gewaschenen *R. culicivora*x werden in 9 cm durchmessende Petrischalen in 40 ml ddH₂O mit 1% (v/v) antibiotischer-antimykotischer Lösung (Sigma A5955) bei 25°C gehalten. Alle drei Tage wird das Medium nach 3 Spülschritten mit sterilem ddH₂O ausgetauscht. Zusätzlich werden tote Nematoden und Häute mit einer ausgezogenen Pasteurpipette entfernt, um eine Kontamination zu vermeiden.

3.5 Präparation von Embryonen

Adulte *C. elegans* werden in einer Schale in ddH₂O mit dem Skalpell beiderseits der Vulva aufgeschnitten, wodurch die frühen Embryonen zugänglich werden. Die meisten anderen Spezies legen ihre Eier im 1-Zell-Stadium ab und die gewünschten Stadien können direkt von den Agarplatten bzw. aus dem ddH₂O mit einer ausgezogenen Pasteurpipette ausgewählt werden.

3.5.1 Präparate für die 4D-Mikroskopie

Die Embryonen werden mit der ausgezogenen Pasteurpipette auf Agarose-Objektträger übertragen und mit 1% (v/v) antibiotischer-antimykotischer Lösung (Sigma A5955) in ddH₂O oder PBS mit Vaseline versiegelt. Durch den Zusatz soll eine Kontamination der bis zu 2 Wochen andauernden Langzeitaufnahmen verhindert werden. Bei sehr starken Kontaminationen der Embryonen vor dem Versiegeln müssen die Eier in Hypochloritlösung 2 min inkubiert und anschließend dreimal mit ddH₂O gewaschen werden.

3.5.2 Präparate für Antikörpermarkierungen

Da Eischale und Vitellinmembran eine Barriere für Antikörper und Fluorophore darstellen, dürfen die Eier nicht direkt für die Antikörperfärbung fixiert werden. Um die Eier der unterschiedlichen Spezies für die Antikörper zugänglich zu machen, werden sie wie unten angegeben behandelt. Das Vorkühlen der Lösungen ist nur für die Präparation früher Embryonalstadien wichtig, damit sich die Embryonen nicht zu schnell entwickeln.

- 1) Embryonen in 15 ml Falcontube in 10°C ddH₂O sammeln
- 2) 1min 4000 rpm (500 xg) zentrifugieren, Überstand absaugen
- 3) Pellet ad 12 ml 10°C Hypochloritlösung, 2min schütteln
- 4) 1min 4000rpm zentrifugieren, Überstand absaugen
- 5) Pellet ad 12 ml 10°C Hypochloritlösung, 2-5min s chütteln
- 6) Pellet 3x in ddH₂O waschen
- 7) Pellet in ddH₂O aufnehmen

Die Embryonen werden auf die vorbereiteten Poly-L-Lysin Objektträger aufgeklebt und mit einem überstehenden Deckglas (24x60 mm) bedeckt. Nachdem überschüssiges Wasser mit einem Tuch abgesaugt ist, werden die Präparate für etwa 10 min in flüssigem Stickstoff inkubiert. Die überstehenden Deckgläser werden mit einem Skalpell abgesprengt und müssen sofort, ohne anzutauen, fixiert werden. Durch das Absprengen des Deckglases werden die Eischalen und Vitellinmembranen der Eier aufgebrochen und die Embryonen sind nach der Fixierung für die weitere Antikörperbehandlung zugänglich.

- 1) Präparat 10 min in -20°C Methanol inkubieren
- 2) Präparat 10 min in -20°C Aceton inkubieren
- 3) Präparat in PBST inkubieren

Für die weitere Antikörperfärbung ist es essentiell, dass die Präparate niemals austrocknen. Um eine unspezifische Bindung des primären Antikörpers möglichst abzublocken, werden die Präparate mit BSA inkubiert. Die primären und sekundären Antikörper werden gemäß der in Handbuch und Literatur angegebenen optimalen Verdünnungen eingesetzt. Zur Fluoreszenzdarstellung der Zellkerne ist der Arbeitslösung des sekundären Antikörpers DAPI zugesetzt.

- 1) Teflonbeschichtung mit Wasserstrahlpumpe und abgeschrägter Pipettenspitze absaugen
- 2) Teflonaussparungen mit 20 µl PBST-BSA 30 min inkubieren
- 3) Primären Antikörper in PBST-BSA enthaltende Teflonaussparungen pipettieren
und in feuchter Kammer dunkel bei 4°C über Nacht inkubieren
- 4) Präparate werden 3x 20 min in PBS gewaschen
- 5) Teflon mit Wasserstrahlpumpe und abgeschrägter Pipettenspitze absaugen
- 6) Teflonaussparungen mit 20 µl PBS inkubieren
- 7) Sekundären Antikörper in PBS enthaltende Teflonaussparungen pipettieren
und in feuchter Kammer dunkel bei Raumtemperatur 4 h inkubieren
- 8) Präparate werden 3x 20 min in PBS gewaschen

- 9) Teflon mit Wasserstrahlpumpe und abgeschrägter Pipettenspitze absaugen
- 10) Präparat mit 6 µl Mounting-Puffer pro Teflonaussparung eindecken und mit Nagellack luftblasenfrei versiegeln

Antikörper	Epitop	Organismus	Verdünnung	Quelle
L416	P-Granula	Maus	1 : 200	(Strome und Wood, 1983)
K76	P-Granula	Maus	1 : 200	(Strome und Wood, 1983)
T9026	α -Tubulin	Maus	1 : 400	Sigma
F5262	Maus IgG	Kaninchen	1 : 400	Sigma

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

Bei den in der Arbeit verwendeten primären Antikörpern handelt es sich durchweg um monoklonale Antikörper. Als sekundärer Antikörper wird ein mit 5µg/ml DAPI versetzter FITC gekoppelter Antikörper verwendet. Die optimalen Verdünnungen, Epitope und Literaturquellen der Antikörper sind aufgelistet.

3.5.3 Agarose-Objektträger

Ein Tropfen einer aufgekochten 3% (w/v) hochschmelzenden Agaroselösung wird zwischen zwei Objektträgern gespreizt. Die Schichtdicke kann durch Abstandshalter modifiziert und reproduziert werden. Die behandelten Objektträger sind in einer feuchten Kammer mehrere Stunden haltbar. Vor der Präparation wird der obere Objektträger seitlich abgezogen und mit seinen Kanten das Agarosekissen zurechtgetrimmt.

3.5.4 Poly-L-Lysin Objektträger

Teflonbeschichtete Objektträger mit einer 6 mm Lochmaske werden gründlich mit Alkohol von Fett und Verschmutzungen gereinigt und 20 min bei 70°C im Trockenschrank inkubiert. Anschließend werden 10 µl Poly-L-Lysin Lösung gleichmäßig dünn auf die heißen Objektträger ausgestrichen und mindestens 2 h bei 70°C getrocknet. Die behandelten Objektträger sind dunkel und trocken gelagert einige Tage haltbar.

3.5.5 Versiegelung von Objektträgern

Zum Schutz der Präparate vor Austrocknung, Oxidation oder Kontamination mit Bakterien und Pilzen werden die einzelnen Objektträger temporär oder permanent versiegelt. Mit auf 50°C vorgewärmter Vaseline werden die Präparate mit einem Pinsel temporär luftdicht versiegelt, das Deckglas lässt sich leicht mit einem Skalpell abheben. Mit schnell trocknendem Nagellack werden die Präparate permanent luftdicht versiegelt, diese Methode eignet sich nicht für Lebendpräparate.

3.6 Lichtmikroskopie

Hellfeld

Dieses Verfahren ist fast ausschließlich für gefärbte Präparate geeignet, hingegen sind ungefärbte lebende Objekte zumeist gar nicht zu sehen. Der Grund hierfür liegt in der mangelnden Fähigkeit des menschlichen Auges schwache Kontrastunterschiede aufzulösen.

DIC - Differential Interference Contrast

Dieses Verfahren wandelt Unterschiede in der optischen Dichte eines Objektes in Kontrastunterschiede des dargestellten Bildes um, gleichzeitig bekommt der Betrachter einen künstlichen räumlichen Eindruck vermittelt. Die maximale Apertur des Kondensors kann hierbei ausgenutzt werden, um lichtintensive, kontrastreiche hochauflösende Bilder zu erhalten.

Polarisationskontrast

Dieses Verfahren nutzt zwei um 90° gegeneinander verschobene „gekreuzte“ Polarisationsfilter. Dabei wird durch den ersten Filter linear polarisiertes Licht vom zweiten Filter nicht durchgelassen und das dargestellte Bild erscheint schwarz. Einige Strukturen, wie doppelbrechende Kristalle, besitzen die Fähigkeit die Schwingungsrichtung des polarisierten Lichtes zu drehen. Strukturen im Objekt zwischen den gekreuzten Polarisationsfiltern erscheinen im Bild aufgehellt gegenüber dem schwarzen Hintergrund.

Fluoreszenz

Dieses Verfahren nutzt die physikalische Eigenschaft eines Fluorophors, Photonen bestimmter Wellenlängen zu absorbieren und langwellig verschoben zu emittieren.

Kurzwelliges UV-Licht kann ein Fluorophor anregen, welches Licht im für das menschliche Auge sichtbaren Spektrum emittiert. Auf diese Weise können, z.B. durch Fluorophor-gekoppelte Antikörper, Strukturen spezifisch mit speziellen Filtersätzen sichtbar gemacht werden.

Konfokaler Laserscan

Bei diesem speziellen Fluoreszenzverfahren liegen Anregungs- und Detektionsfokus konfokal. Optische Informationen außerhalb der Fokusebene werden so weder direkt angeregt noch detektiert. Ein Laserstrahl regt etwaige Fluorophore immer nur punktuell an und rastert ein Objekt auf multiplen Fokusebenen ab. Die so gewonnenen Daten werden am Computer zu einer 3D-Rekonstruktion des untersuchten Objektes zusammengesetzt.

3.7 Die 4D-Mikroskopie

Bei einer normalen Zeitrafferaufnahme kann immer nur eine Fokusebene betrachtet werden. Durch Zellbewegungen können sich die fokussierten Zellen jedoch leicht aus dieser Ebene herausbewegen. Die 4D-Mikroskopie erlaubt durch multiple Fokusebenen eine quasi dreidimensionale Darstellung eines Objektes über die vierte Dimension Zeit. Einzelne Zellen bis hin zum gesamten Zellverband können selbst bei starker Zellbewegung auf den multiplen Fokusebenen der 4D-Zeitrafferaufnahme verfolgt werden. Diese ursprünglich von Hird und White (1993) beschriebene Methode wurde von Schnabel et al. (1997) weiterentwickelt und inzwischen modifiziert. Eine auf C++ basierende Software steuert ein motorisiertes Mikroskop. Hierdurch können die Brennweite der Optik reguliert und die einzelnen Fokusebenen schnell, erschütterungsfrei und mikrometergenau nacheinander angesteuert werden. Das Programm führt in einem programmierbaren Zeitintervall einen Z-scan durch, d.h. der Embryo wird mit einer programmierbaren Anzahl an multiplen Fokusebenen entlang der Z-Achse aufgenommen (Abb. 10). Die so gewonnenen analogen Z-Bilderstapel werden durch einen Framegrabber digitalisiert, anschließend komprimiert und auf Festplatten gespeichert. Die Daten stehen unter anderem für Zellstammbaumanalysen zur Verfügung. Die aufgenommenen Z-Bilderstapel (Abb. 9) der 4D-Zeitraffung werden mit Hilfe der Software Simi[®]-Biocell[®] V.4.1.155 (Schnabel et al., 1997) manuell ausgewertet. Durch Markierung der Zellkerne und Mitosen der einzelnen Zellen werden die dreidimensionalen Positionsdaten gegen die Zeit korreliert. Die so gewonnenen Daten werden von dem Programm als Zellstammbaum gegen die Zeit aufgetragen und als frei drehbares 3D-Kugelmodell räumlich dargestellt (Abb. 9). So ist es einfach möglich z.B. die Zellzykluslängen, Zellteilungsrichtungen, Zellmigrationen, Gastrulation, Organogenese u.v.m. im unmanipulierten Wildtyp zu untersuchen und mit manipulierten oder mutierten Phänotypen zu vergleichen. Darüber hinaus können die Zellstammbäume unterschiedlicher Spezies untereinander und z.B. mit Referenz-Stammbäumen von *C. elegans* (Sulston et al., 1983) oder *P. marina* (Houthoofd et al., 2003) verglichen werden und somit Aussagen über evolutionäre Modifikationen getroffen werden.

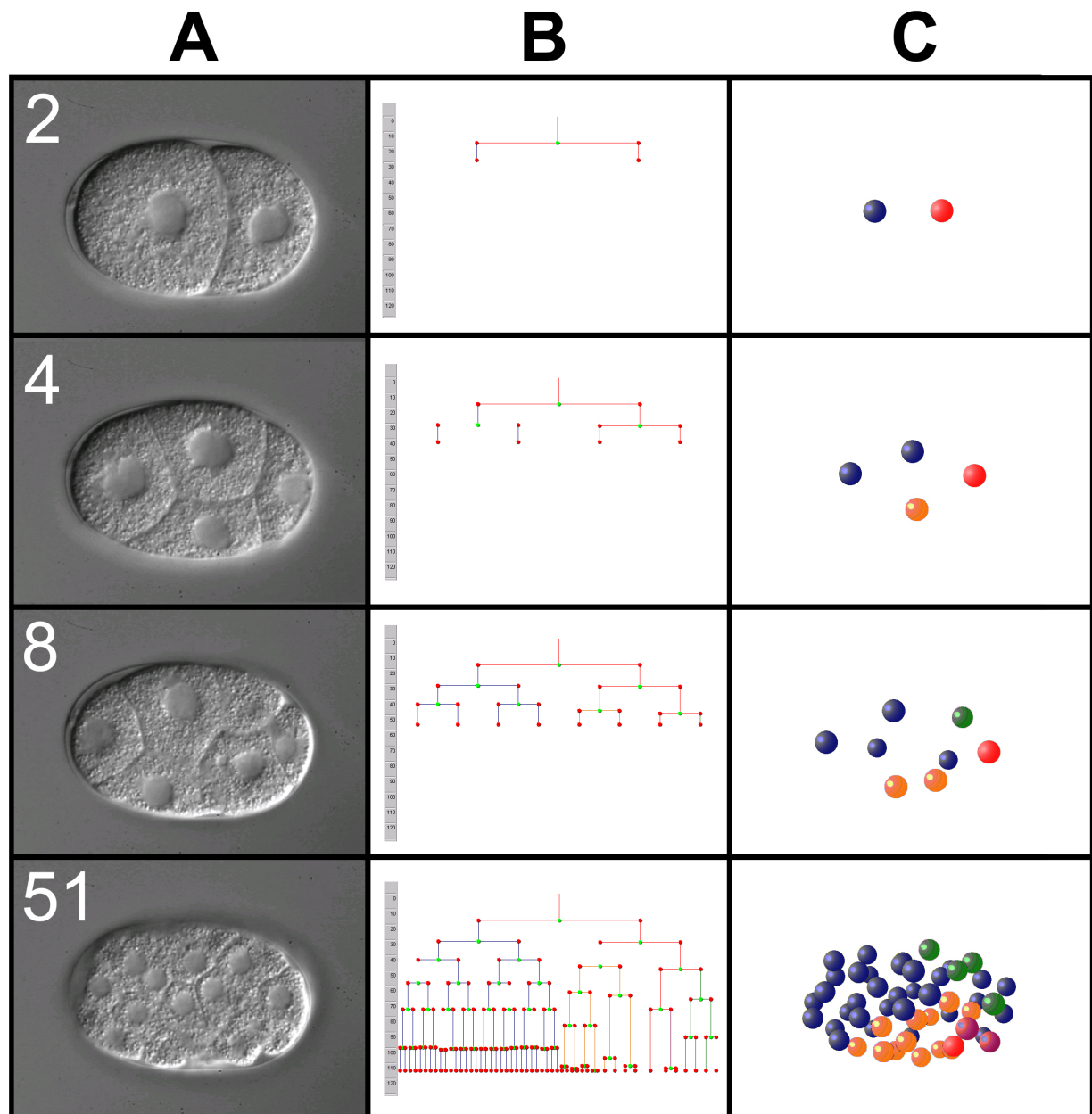


Abb. 9: Konstruktion von Zellstammbäumen und 3D-Modellen mit Simi®-Biocell®

A) Fokusebene eines Z-scans durch einen *C. elegans* Embryo mit 25 Fokusebenen und 30 sec Zeitintervallen zwischen den Aufnahmen. Dargestellt sind die 2-, 4-, 8- und 51-Zellstadien. **B)** Zellstammbaumrekonstruktion gegen die Zeit, Mitosen (hellgrüne Kreise) und Zellzykluslängen sind eingezeichnet. **C)** Durch Markierung der Zellkerne im Raumkoordinatensystem können die Zellen als 3D-Modell dargestellt werden. Es ist möglich einzelnen Zellen, Zellgruppen oder Organen unterschiedliche Farben zuzuordnen. – Anterior links, Embryo etwa 56µm in der Längsachse. Den Gründerzellen sind folgende Farben zugeordnet: AB (blau), EMS (orange), C (grün), D (violett), P (rot).

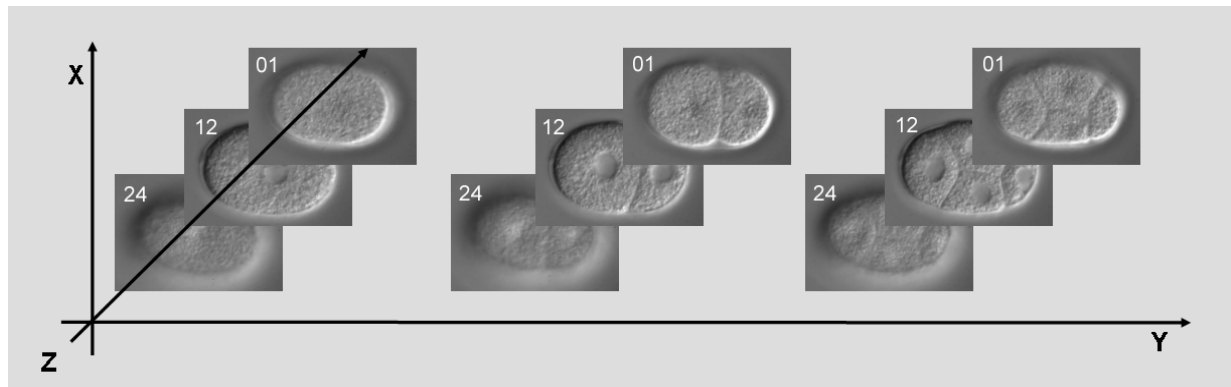


Abb. 10: Die 4D-Zeittraffer

Die Steuerungssoftware führt in einem programmierbaren Zeitintervall einen Z-scan mit programmierbarer Anzahl an Focusebenen aus. Auf diese Weise entsteht eine quasi dreidimensionale Darstellung eines Objektes über die vierte Dimension Zeit.

3.8 Elektronenmikroskopie

Hochdruckeinfrierung und Gefriersubstitution (nach McDonald et al., 2007)

Klassische chemische Fixierungsmethoden dringen ohne aufwendige Präparationsmethoden zum Teil erst nach mehreren Stunden durch die Eischale und Vitellinmembran. Hierdurch kommt es zu unerwünschten Fixierungsartefakten und eine Untersuchung bestimmter entwicklungsbiologischer Zeitfenster wird fast unmöglich, da Embryonen nicht augenblicklich fixiert werden können. Durch die Hochdruckeinfrierung mit anschließender Gefriersubstitution können Präparate bestimmter Entwicklungsstadien gezielt eingefroren und mit einem Minimum an Artefakten augenblicklich fixiert werden (Abb. 11).

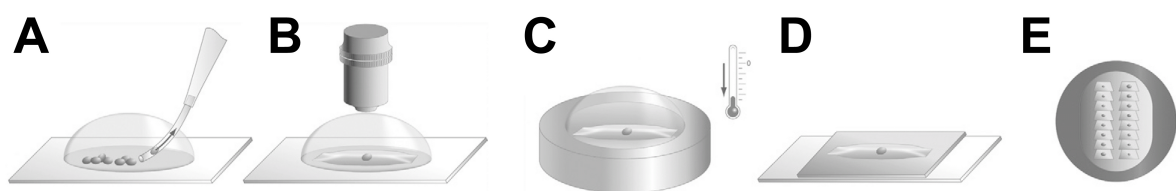


Abb. 11: Schematische Darstellung der EM-Präparation

Vereinfachte Darstellung des Präparationsablaufes spezifischer Embryonalstadien, modifiziert nach McDonald et al. (2007) **A)** Embryonen werden in M9-BSA überführt, einzeln in Zellulose Microloader Pipettenspitzen aufgenommen und durch trimmen mit einem Skalpell in der Zellulosekapillare versiegelt. **B)** Die Entwicklung einzelner Embryonen wird bis zum gewünschten Stadium unter dem Lichtmikroskop mit DIC und Hellfeld verfolgt. **C)** Diese Stadien werden eingefroren und durch Gefriersubstitution fixiert. **D)** Fixierte Objekte werden auf Objektträgern eingebettet. **E)** 70nm Serienschnitte werden angefertigt und auf Kupfergrids für die Elektronenmikroskopie aufgebracht.

Die Embryonalstadien werden lichtmikroskopisch beobachtet und in versiegelten Zellulosekapillaren mit spezifischen Embryonalstadien einzeln in einem Hochdruckgefrierer mittels eines „rapid transfer systems“ (RTS) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dabei vergehen von der lichtmikroskopischen Beobachtung bis zur sofortigen Kryoimmobilisierung

im Hochdruckgefrierer etwa 5 sec. Die Zellulosekapillaren können in flüssigem Stickstoff praktisch unbegrenzt gelagert werden. Für die Gefriersubstitution werden sie im Gefriersubstitutionsmix bei -90°C für 8-24 h im Gefriersubstitutionsautomaten inkubiert und dann mit einer Rate von 5°C/h auf Raumtemperatur gebracht. Nach fünf Waschschritten mit wasserfreiem Aceton erfolgt die Epon/Araldit Kunstharzeinbettung bei Raumtemperatur mit Hilfe einer aufsteigenden Reihe von Kunstharz in Aceton. 25% Kunstharz für 2 h, 50% Kunstharz für 3 h, 75% Kunstharz für 4 h, 100% Kunstharz für 4 h, für 12 h und erneut für 4 h. Im Anschluss werden die mit Kunstharz infiltrierten Zellulosekapillaren in einer dünnen Kunstharzschicht zwischen gereinigten Objektträgern so eingebettet, dass die Embryonen für die späteren Serienschnitte optimal ausgerichtet sind, und für 48 h bei 60°C zur Polymerisation inkubiert. Mit einem Skalpell werden die Embryonen unter einem Binokular in etwa 1 mm² großen Kunstharzstücken ausgeschnitten und mittels Epoxykleber auf Ultramikrotomhaltern ausgerichtet und aufgeklebt. Der Kleber wird für 0,5 h bei 30°C zur Polymerisation inkubiert und anschließend werden die Proben in Vorbereitung auf die Serienschnitte vorgetrimmt. Serienschnitte werden in 2-3 Reihen zu 10-13 Schnitten á 75 nm auf beschichtete Kupfergrids in der richtigen Schnittreihenfolge übertragen. Im Anschluss werden die Serienschnitte in 2% Uranylacetat, gelöst in 70% Methanol, gefolgt von Reynolds Bleizitrat Lösung nachgefärbt und stehen für die Elektronenmikroskopie zur Verfügung (Müller-Reichert, persönliche Mitteilung).

3.9 Laserablationsexperimente

Ein Laser eröffnet eine Vielzahl von Manipulationsmöglichkeiten an Embryonen und Würmern. So ist es möglich ohne die Eröffnung der Eischale einzelne Blastomeren letal oder subletal zu ablatieren. Durch subletale Ablation können gezielt Zellregionen oder Organellen ausgeschaltet, bzw. der Zellteilungsrythmus der bestrahlten Zelle verlangsamt werden. Durch Eröffnung der Eischale können in geeigneten Zellkulturmedien gelöste Substanzen in das Ei eingebracht werden, bzw. spezifische Zellen durch leichtes Quetschen aus dem Zellverband entnommen und außerhalb der Eischale inkubiert werden. Durch letale Ablation oder gezielter Entnahme von spezifischen Zellen kann deren Einfluss auf den Zellverband des restlichen Embryos untersucht werden.

Die Ablationen werden mit einem Farbstofflaser ($\lambda = 453 \text{ nm}$) durchgeführt, dabei ist die Stärke des Lasers proportional zur Größe der Löcher, die er in ein Deckglas brennt, und muss vor jeder Experimentserie überprüft werden. Die Dauer der Bestrahlung variiert mit der Stärke des Lasers, der Zellgröße und der Wassersäule über dem Embryo. Darüber hinaus ist sie bei letalen und subletalen Ablationen unterschiedlicher Spezies durch Vorexperimente zu bestimmen.

Geeignete Embryonalstadien werden für Antikörperuntersuchungen auf Poly-L-Lysin bzw. für Lineagestudien auf Agarose-Objektträger präpariert (Kapitel 3.5.4). Dabei ist darauf zu achten, dass die Wassersäule über dem Embryo möglichst gering ist, um eine Streuung des Lasers zu minimieren. Bei der letalen Ablation wird der Zellkern, bei der subletalen die gewünschte Zellregion in der gesamten Ausdehnung, durch Fokussierung innerhalb der drei Raumebenen, bestrahlt. Um eine Überhitzung und Schädigung des gesamten Embryos zu verhindern, müssen sich Serien von Bestrahlung und Abkühlungspause abwechseln. Letal ablatierte Zellen weisen keinen oder einen rauen Zellkern auf und teilen sich nicht weiter, die subletal ablatierten Zellen weisen zumeist einen leicht veränderten Zellteilungsrythmus auf. Laserbestrahlung von *R. culicivora* erfolgt in 5x 1 min Intervallen mit jeweils 2 min Pause dazwischen.

3.10 Zentrifugationsexperimente

Die Erdbeschleunigung g gibt die Beschleunigung eines sich im freien Fall befindlichen Körpers im Schwerfeld der Erde an. Dabei beträgt die einfache Erdbeschleunigung im Mittelwert $g = 9,81 \text{ m/s}^2$. Bei Zentrifugation wird die effektiv wirkende Beschleunigung in Xg , dem vielfachen von g angegeben. Zur Berechnung der in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor erreichten Xg wird die unten angegebene Formel herangezogen.

Gegebene Größen:

U = Umdrehungszahl / min

r = Radius Rotationsachse zum Objekt in Metern

Berechnung von Xg :

$$T = 60 / U$$

T Umlaufzeit in sec

$$\omega = 2\pi / T$$

ω Winkelgeschwindigkeit

$$a = r \cdot \omega^2$$

a Zentrifugalbeschleunigung

$$Xg = a / 9,81 \text{ m/s}^2$$

Xg x-fache Erdbeschleunigung

Embryonen werden mit einer ausgezogenen Pasteurpipette aufgenommen und auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger (3.5.4) gerichtet aufgeklebt. Durch eine Behandlung mit Hypochloritlösung kann eine bessere Haftung auf den Objektträgern erreicht werden. Die Präparate werden in auf 10°C gekühltem PBS in Zentrifugenröhrchen mit einer speziellen Schutzhalterung (Abb. 12) zentrifugiert, um ein zerbersten der Objektträger zu verhindern.

Alternativ zum gekühlten PBS kann eine Kühlzentrifuge verwendet werden, um einen schädlichen Anstieg der Temperatur während des Zentrifugationsprozesses zu verhindern. Während der Zentrifugation erfolgt eine Auftrennung der Zytoplasmabestandteile entsprechend ihrer Dichte zum zentrifugalen Pol, wo sich die schwersten Komponenten ansammeln.

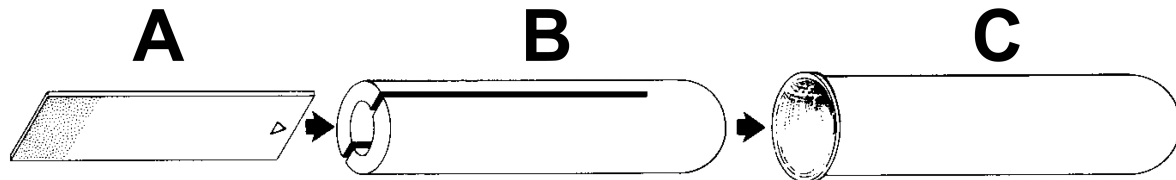


Abb. 12: Zentrifugation von Embryonen

Abb. modifiziert nach Schlicht und Schierenberg (1991). Die Zentrifugalkraft während der Zentrifugation wirkt und der zentrifugale Pol liegt in Pfeilrichtung, der zentripetale Pol entgegengesetzt. **A)** Präparate auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger, **B)** Kunststoffhalterung zur Fixierung der Objektträger, **C)** Mit PBS gefülltes Zentrifugenröhrchen.

3.11 Melaninnachweise (nach Romeis, 1989)

Bei Melanin handelt es sich um braunschwarze Pigmente, die unlöslich in Wasser und organischen Lösungsmitteln sind. Adulte Nematoden werden 48 h in Einbettkassetten mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd bei 4°C inkubiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke werden für das Mikrotom vorgetrimmt und 6 µm starke Serienschnitte angefertigt von denen je zwei Schnitte auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht werden

Paraffineinbettung im Automaten

- | | |
|-----------------------|----|
| 1) 2 h 70% Ethanol | 2x |
| 2) 1 h 96% Ethanol | 2x |
| 3) 1 h 100% Ethanol | 3x |
| 4) 1 h Chloroform | 2x |
| 5) 1 h Paraplast 60°C | 2x |

Entparaffinieren	/	Aufsteigende Alkoholreihe
1) 100% Xylol	5 min	5)
2) 100% Xylol	5 min	4)
3) 100% Ethanol	1 min	3)
4) 75% Ethanol	1 min	2)
5) 50% Ethanol	1 min	1)

Argentaffine Reaktion

- 1) Präparate Entparaffinieren und anschließend in ddH₂O inkubieren
- 2) 10 min mit Lugolscher Lösung inkubieren
- 3) 2 min mit 5%iger Natriumthiosulfatlösung inkubieren
- 4) 3x 1 min in ddH₂O waschen
- 5) Präparate 24 h dunkel in Fontanascher Lösung inkubieren
- 6) 3x 1 min in ddH₂O waschen
- 7) 3 min mit 0,2%iger Goldchloridlösung inkubieren
- 8) 3x 1 min in ddH₂O waschen
- 9) 2 min mit 5%iger Natriumthiosulfatlösung inkubieren
- 10) Ausspülen in ddH₂O
- 11) 2 min mit 1%iger Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung inkubieren – OPTIONAL
- 12) Ausspülen in ddH₂O – OPTIONAL
- 13) Aufsteigende Alkoholreihe, Präparate in Xylol eindeckeln

Kerne sind optional rot gefärbt, Melanin und andere argentaffine Granula schwarz.

Eisenmethode für Melanin

- 1) Präparate entparaffinieren in ddH₂O inkubieren
- 2) 1 h mit 2,5%iger Ferrosulfatlösung inkubieren
- 3) 4x 5 min in ddH₂O waschen
- 4) 0,5 h mit 1% Kaliumferrizyanid in 1%iger Essigsäure inkubieren
- 5) 2 min mit 1%iger Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung inkubieren – OPTIONAL
- 6) Ausspülen in ddH₂O – OPTIONAL
- 7) Aufsteigende Alkoholreihe, Präparate in Xylol eindeckeln

Kerne sind optional rot gefärbt, Melanin dunkelblau bis dunkelgrün.

3.12 Nomenklatur

Da die Untersuchungen in dieser Arbeit gravierende Schicksalstransformationen zwischen einzelnen Gründerzellen aufdecken, ist eine schicksalsunabhängige Nomenklatur zwingend erforderlich, da Zellschicksale nicht an eine spezifische Gründerzelle gekoppelt sind. Durch die Einführung einer zusätzlichen Nomenklaturebene (S-Nomenklatur; Boveri, 1899; 1910) wird die Unterscheidung und Entkopplung zwischen Abstammung (S1-S4) und Schicksal (AB, E, MS, C, D; Sulston et al. 1983) einer Gründerzelle im invarianten Zellstammbaum ermöglicht. Die S-Nomenklatur ist wertneutral und trifft abgesehen von der Keimbahn keinerlei Aussagen über das Schicksal der somatischen Gründerzellen. Da *C. elegans* als Referenzsystem dient, entsprechen sich die Nomenklatur der Abstammung und des Schicksals (S1=AB, S2a=MS, S2p=E, S3=C, S4=D) und die Transformationen werden erst beim Vergleich mit phylogenetisch entfernten Arten offensichtlich.

3.13 Lösungen

Cholesterinlösung

1 g Cholesterolin
ad 200 ml Ethanol (95%)

Einfriermix

50 ml M9
50 ml Einfrierpuffer
150 µl MgSO_4 (0,1M)

Einfrierpuffer

300 g Glycerin
5,9 g NaCl
6,8 g KH_2PO_4
560 µl NaOH (5M)
ad 1000 ml ddH₂O

Gefriersubstitutionsmix (nach McDonald und Müller-Reichert, 2002)

1% Osmium Tetroxid
0,1% Uranyl Acetat
in wasserfreiem Aceton

Hypochloritlösung

12 ml HOCl
5 ml KOH (5M)
ad 100 ml dH₂O

Fontanasche Silberlösung

5% Silbernitratlösung
Tropfenweise unter Rühren solange Ammoniak zugeben, wie sich der entstehende Niederschlag auflöst. Der klaren Lösung unter Rühren tropfenweise 5% Silbernitrat zugeben, bis ein zarter Opalglanz bestehen bleibt.

M9 Puffer

3 g KH_2PO_4
6 g Na_2HPO_2
5 g NaCl
1 ml MgSO_4 (1M)
ad 1000 ml ddH₂O

M9 BSA

2 g BSA
ad 10 ml M9 Puffer

Mounting Puffer

10 ml Glycerin, wasserfrei
10 ml 2x PBS
1 mg/ml p-Phenylendiamin, bei Bedarf frisch ansetzen

PBS Puffer (nach Brenner, 1974)

4 mM KH_2PO_4
16 mM Na_2HPO_4
115 mM NaCl
pH 7,4 einstellen, ad 1000ml dH₂O, autoklavieren

PBST Puffer

4 mM KH_2PO_4
16 mM Na_2HPO_4
115 mM NaCl
0,1% (v/v) Tween-20
pH 7,4 einstellen, ad 1000 ml dH_2O , autoklavieren

PBST-BSA

2% (w/v) BSA
0,5% (v/v) Tween-20
0,02% (w/v) NaN_3
Lösungsmittel: PBS

Poly-L-Lysin Lösung (nach Cole und Schierenberg, 1986)

200 ml dH_2O
400 mg Gelatine (Sigma), bei 60°C lösen
40 mg $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$, bei 40°C lösen
1 mg/ml Poly-L-Lysin (MG > 300.000), 12h lösen
aliquotieren und bei 4°C bis zu 1 Jahr lagern

3.14 Medien

***E. coli* Anzuchtmedium (nach Brenner, 1974)**

20 g Pepton
5 g NaCl
0,01 g Uracil
pH 7,4 einstellen, ad 1000 ml dH_2O , autoklavieren

LB

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
0,01 g Uracil
(15 g Agar-Agar; nur für Agarplatten zugeben)
pH 7,4 einstellen, ad 1000 ml dH_2O , autoklavieren

salzhaltige Agarplatten (nach Brenner, 1974)

20 g Agar-Agar
2,5 g Select Pepton 140
3,0 g NaCl
ad 1000 ml dH_2O , autoklavieren
Medium <50°C abkühlen lassen und folgende sterile Lösungen zugeben, Magnetrührer.
1,0 ml Cholesterinlösung
0,5 ml 1 M CaCl_2 Lösung
1,0 ml 1 M MgSO_4 Lösung
25 ml 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6

salzfreie Agarplatten (nach Lahl et al., 2003)

20 g Agar-Agar
ad 1000 ml dH_2O , autoklavieren
1 ml sterile Cholesterinlösung

4. Ergebnisse

Sieh überall mit Deinen eigenen Augen.

Verunstalte nichts; beschönige nichts.

Wie die Folgerungen fließen, so lass sie fließen.

Hemme ihren Strom nicht, lenke ihn nicht.

G.E. Lessing

4.1 Untersuchungen an Vertretern der Rhabditia

In *C. elegans* (Clade 9) sind Zellteilungsrhythmen und exakte Zell-Zell-Kontakte essentiell, da nur in kompetenten Zellen zeitfensterabhängige Induktionen stattfinden, um spezifische Zellschicksale zu determinieren (s. Einleitung; Schierenberg, 1997; Schnabel und Priess, 1997). Untersuchungen an *A. megalcephala* (Clade 8; Müller, 1903), *P. marina* und *C. briggsae* (beide Clade 9; Houthoofd et al., 2003; Zhao et al., 2008) zeigen bei der frühen embryonalen Musterbildung und bei der Schicksalsverteilung im Zellstammbaum große Ähnlichkeiten zu *C. elegans*. Diesen vier Spezies ist es jedoch gemein, dass sie ein rhombusförmiges 4-Zell Stadium ausbilden, welches als ursprünglich für die Rhabditia (Claden 7-12) angesehen wird und im Kontrast zu Spezies mit einem linearen Zellarrangement steht (Dolinski et al., 2001). Ein lineares Zellarrangement lässt jedoch den spezifischen Zell-Zell Kontakt zwischen P2 und S1p nicht zu, so dass das Schicksal ABp nicht wie bei *C. elegans* induziert werden kann.

Um zu überprüfen, ob sich S1a und S1p in Spezies mit linearem Zellarrangement trotzdem unterschiedlich voneinander verhalten und spätere Zell-Zell Kontakte sowie Zellgruppierung („cell focusing“, siehe Einleitung; Bischoff und Schnabel, 2006; Schnabel et al., 2006) innerhalb ihrer Nachkommen ähnlich wie bei *C. elegans* ausgebildet werden, wurde mit der 4D-Analyse von *D. coronatus* (Clade 9), *A. nanus* und *Acrobeloides* sp. (PS1146; beide Clade 11) begonnen.

Um die Lücke zwischen den untersuchten Claden 9 und 11 zu schließen, wurde der Analyse *Panagrolaimus* sp. ES444 (Clade 10) hinzugefügt, ein Vertreter der Rhabditia mit rhombusförmigen 4-Zell Stadium.

4.1.1 Untersuchungen an *Diploscapter coronatus*

Der Embryo von *D. coronatus* (Clade 9) füllt eine längliche, ovale Eischale fast vollständig aus (Abb. 13a). Wie bei *C. elegans* teilen sich bei *D. coronatus* die Keimzellen stammzellartig asymmetrisch in einer Reihe entlang der anterior-posterioren Körperachse, jedoch ohne das Auftreten einer Polaritätsumkehr (Abb. 13a-d, m). Anders als bei *C. elegans* (Abb. 6) teilen sich die Zellen S1 und P1 in anterior-posteriorer Orientierung und es kommt zu einer linearen Anordnung des 4-Zell Embryos (Abb. 13b, c), in welcher es zu keinem Zell-Zell Kontakt zwischen P2 und S1p (Abb. 13c) oder P3 und S1p kommt (Abb. 13d). Durch ein späteres Zellrearrangement kommt lediglich in etwa der Hälfte der untersuchten Embryonen (n=10) ein Zell-Zell Kontakt zwischen P3 und S1p bzw. zwischen P4 und den Nachkommen von S1p zustande (nicht gezeigt). Folglich muss eine Induktion durch P2, welche das ABp Schicksal in S1p wie bei *C. elegans* festlegt, unterbleiben und auch eine

zeitlich spätere Induktion ausgehend von P3 bzw. P4 durch direkten Zell-Zell Kontakt kann ausgeschlossen werden.

Zellstammbaumanalysen und 3D-Rekonstruktionen zeigen, dass ähnlich wie für *C. elegans* beschrieben (Schnabel et al., 1997) die Zellzykluslängen und Teilungsfolgen in *D. coronatus* zwischen einzelnen Individuen leicht variabel, jedoch die durchschnittlichen Zellteilungsabfolgen und Zellzykluslängen invariant sind (Abb. 13m). Die Zellzykluslängen sind für einzelne somatische Gründerzellen charakteristisch und es ist ein Gradient zwischen S1 (schnelle Zyklen) und S4 (langsame Zyklen) zu erkennen. Anders als bei *C. elegans* ist die durchschnittliche Zellzykluslänge der Keimbahn schneller als die ihrer somatischen Schwestern. Obwohl die frühe räumliche Musterbildung leicht variabel ist, münden alle beobachteten Embryonen in einem gleichen Muster mit einem Kontakt zwischen Darmvorläuferzelle und Keimbahn (Abb. 13e, f).

Die Gastrulation von *D. coronatus* beginnt wie bei *C. elegans* mit der Einwanderung zweier Darmvorläuferzellen assoziiert mit der Keimbahn, jedoch hat sich P4 zu diesem Zeitpunkt bereits geteilt (Abb. 13f). Es können weder Blastocoel noch sichtbare flüssigkeitsgefüllte Hohlräume beobachtet werden (Abb. 13). Mesodermale Zellen wandern von der ventralen Körperseite unter Formation eines kleinen ovalen Blastoporus ein (Abb. 13i). Epidermale Zellen beginnen sich über die ventrale Seite des Embryos auszubreiten und den Blastoporus zu schließen (Epibolie; Abb. 13j, k). Mund und Anus werden wie bei *C. elegans* jeweils durch neue sekundäre Durchbrüche geschaffen (Abb. 13l).

Der Embryo von *D. coronatus* ist bilateralsymmetrisch aufgebaut. Nachkommen der Gründerzellen S2, S3 und S4 ordnen sich rechts und links der Mittellinie an und tragen bilateralsymmetrisch zur Organogenese bei (nicht gezeigt). Die Symmetrie innerhalb der S1 Nachkommen wird jedoch durch die anteriore Verlagerung der S1a1 und S1p1 gegenüber ihren rechten Schwesterzellen und deren Nachkommen wie in *C. elegans* gebrochen (Abb. 13n und 14). Zellstammbaumanalysen und 3D-Rekonstruktionen zeigen, dass sich S1a und S1p in *D. coronatus* unterscheiden und den Schicksalen und Regionen von ABa und ABp in *C. elegans* stark ähneln. Zum einen entsprechen sich die räumlichen Musterbildungen von S1a und S1p zwischen *D. coronatus* und *C. elegans* zu einem hohen Grad (Abb. 5 und 14) und tragen bei beiden zu Nerven-, Pharynx- und Hypodermisstrukturen bei. Zum anderen deuten leichte Unterschiede in der Zellzykluslänge auf Unterschiede zwischen S1a und S1p hin, wobei letztere etwa 4-7 min schneller ist (n=10). Zell-Zell Kontakte, welche bei *C. elegans* für die 3., 4. und 5. Induktion nötig sind (Abb. 4 und 5), könnten potentielle Induktionen bei *D. coronatus* ermöglichen (Abb. 14), um die bilaterale Symmetrie sekundär innerhalb der S1 Nachkommen wieder herzustellen. Frühe programmierte Zelltode dienen bei *C. elegans* und nahen Verwandten (Clade 9; Houthoofd et al., 2003; Sulston et al., 1983; Zhao et al., 2008) als Marker zur Unterscheidung zwischen ABa und ABp Schicksalen, da

diese immer nur in einem der beiden ABx Teilstammbäume auftreten, wohingegen sich die korrespondierende Zelle des anderen Teilstammbaumes erneut teilt. Eine stichprobenartige Analyse der frühen Zelltoide innerhalb des S1 Teilstammbaumes von *D. coronatus* (Tabelle 4; jeweils n=2) zeigt ebenfalls einen Unterschied zwischen S1a und S1p an, so dass berechtigterweise von den Schicksalen ABa und ABp gesprochen werden kann.

<i>D. coronatus</i>			
Zelltode in ABa		Zelltode in ABp	
ABala pap aa	prog. Zelltod	Zellteilung	ABpla pap aa
ABala ppa aa	prog. Zelltod	Zellteilung	ABpla ppa aa
ABalp paa pa	prog. Zelltod	Zellteilung	ABplp paa pa
ABala pap aa	Zellteilung	prog. Zelltod	ABpla pap aa

Tabelle 4: Frühe Zelltoide in *D. coronatus* und *C. elegans*

Eine partielle Analyse der auftretenden frühen programmierten Zelltoide in den korrespondierenden Teilstammbäumen ABa und ABp von *D. coronatus* zeigt eine exakte Übereinstimmung mit den auftretenden Zelltoden in den entsprechenden Teilstammbäumen von *C. elegans*. Darüber hinaus zeigten sie einen Unterschied in den Schicksalen (programmierter Zelltod vs. Zellteilung) von ABa und ABp an.

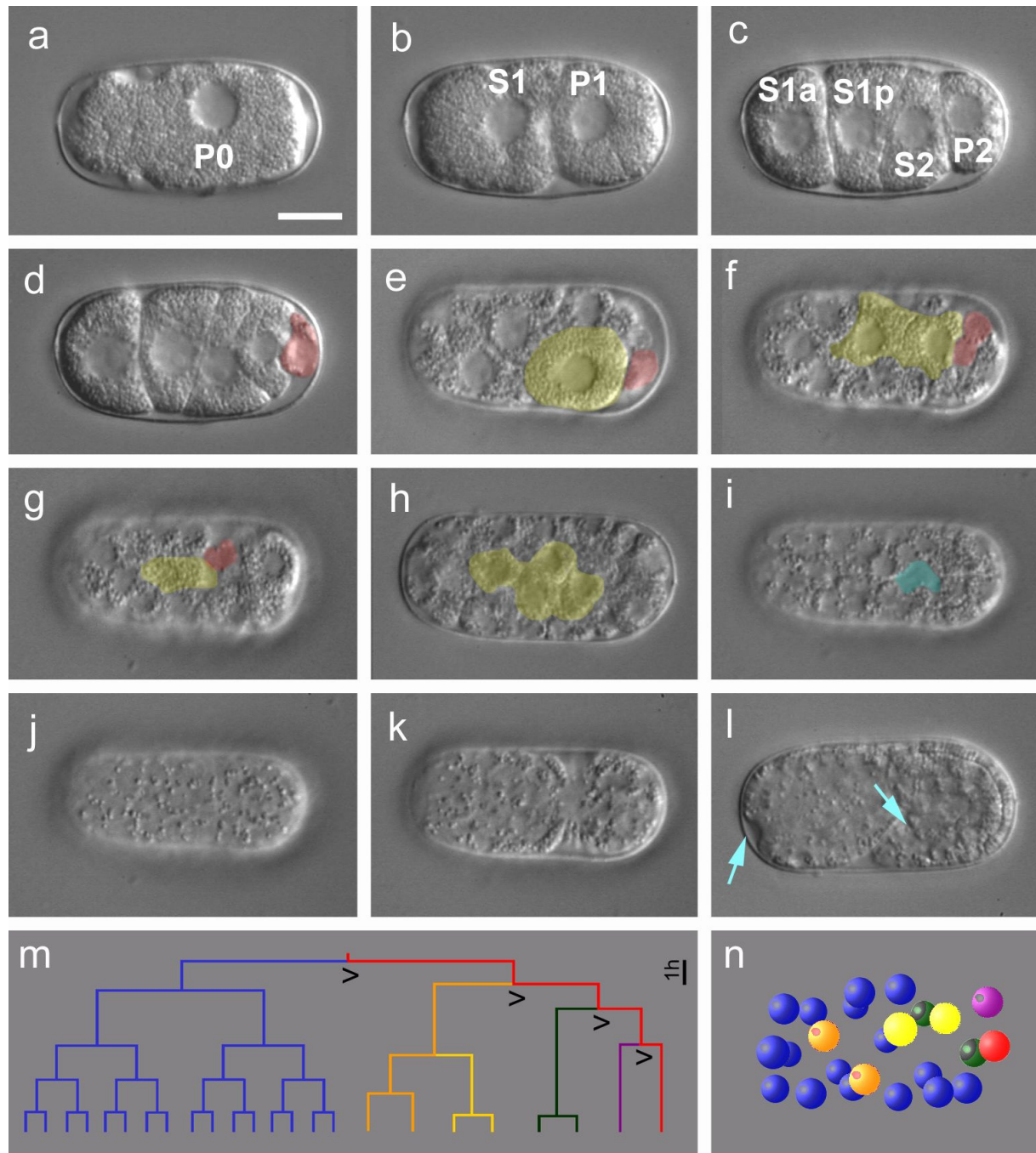


Abb. 13: Musterbildung, fehlende Polaritätsumkehr und Gastrulation von *D. coronatus*

a-b) 1-Zell Stadium, P0 teilt sich longitudinal asymmetrisch. **b-d)** P1 und P2 teilen sich longitudinal asymmetrisch, S1 longitudinal symmetrisch, es entsteht ein lineares 5-Zell Stadium. **e)** Die Darmvorläuferzelle S2p (gelb) markiert den ventralen Pol, Nachkommen von S1 definieren die links-rechts Körperachse. **f-h)** Gastrulationsbeginn, zwei Darmzellen gefolgt von den P4 Töchtern (Z2+Z3) beginnen einzuwandern, kein Blastocoel. **i)** Durch den sich formenden Blastoporus (türkis) wandern Zellen ein. **k)** Durch Epibolie wird der Blastoporus überwachsen. **l)** Mund- und Anusöffnung entstehen durch einen neuen sekundären Durchbruch (hellblaue Pfeile). **m)** In einer Reihe von stammzellähnlichen asymmetrischen Zellteilungen entstehen die Gründerzellen S1 (blau), S2 (orange), S3 (dunkelgrün), S4 (lila) und P3/P4 (rot) entlang der anterior-posterioren Körperachse. Keine Polaritätsumkehr, Zellzykluslängen und asymmetrische Zellteilungen (<=>) sind eingezeichnet. **n)** 3D Kugelmodell des in m) dargestellten Zellstammbaumes. **Orientierung:** anterior links, a-e,l) linke Lateralansicht, f-k, n) Ventralansicht. **Eichstrich** 10µm.

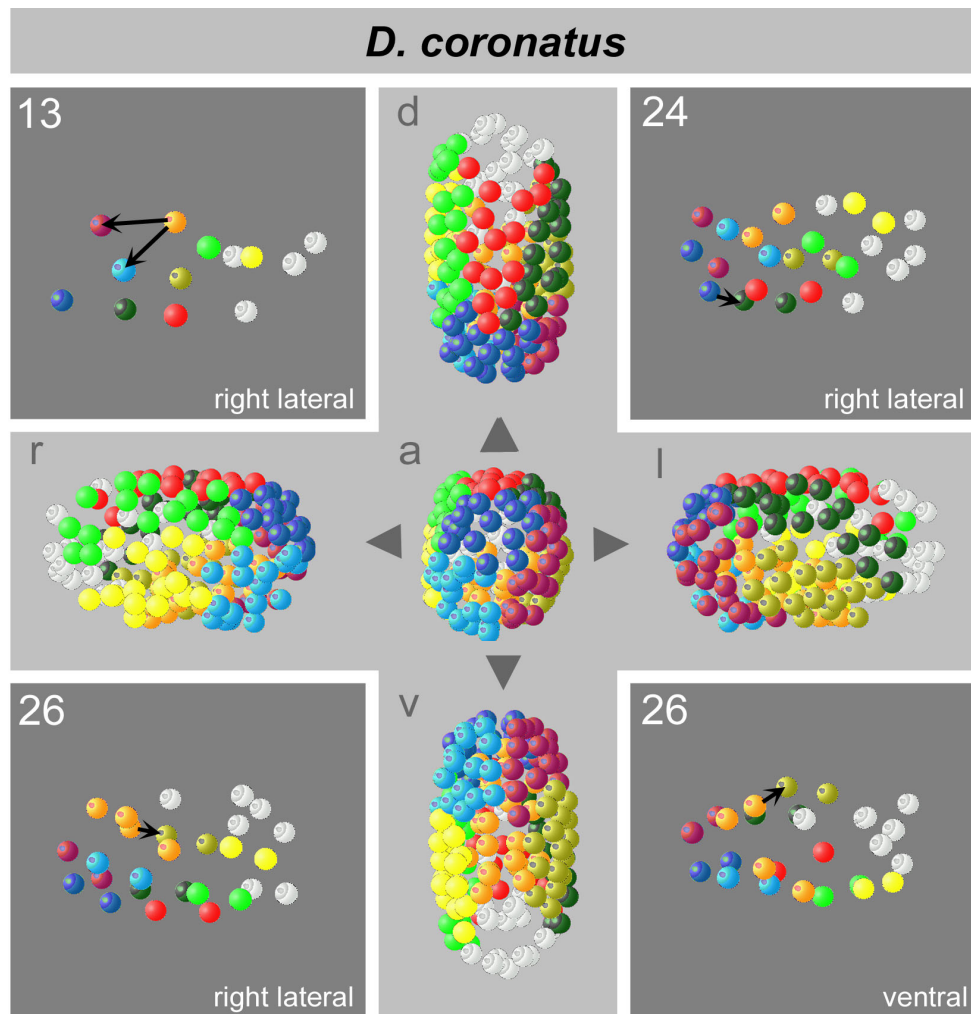


Abb. 14: Zellkontakte und Zellgruppierungen in *D. coronatus*

Mit SIMI®-BIOCELL® rekonstruierte 3D-Kugelmodelle der Zellkernpositionen unterschiedlicher Embryonalstadien von *D. coronatus*. Arrangement der Zellkerne zeigt für potentielle Zell-Zell Induktionen nötige Zellkontakte (schwarze Pfeile). Im 13-Zell Stadium berührt S2a (MS) die S1 Nachkommen S1alp und S1ara, im 24-Zell Stadium berührt S1alap die Zelle S1plaa und im 26-Zell Stadium berührt S2ap (MS) S1plpa. Nachkommen der acht S1 Zellen des 12-Zell Stadiums gruppieren sich in Regionen. Orientierung des 13, 24 und 26 Zellstadiums: anterior links. Orientierung des 128 S1-Stadiums: a) anteriore Ansicht, Drehung um 90° resultiert in einer (r) rechten, (l) linken, (d) dorsalen beziehungsweise (v) ventralen Ansicht des Kugelmodells, deren anteriore Pole zur Mitte ausgerichtet sind. **Farbcodierung:** s. Abb. 5.

4.1.2 Untersuchungen an *Acrobeloides nanus*

Die Keimzellen von *A. nanus* (Clade 11) teilen sich wie bei *C. elegans* stammzellartig asymmetrisch in einer Reihe entlang der anterior-posterioren Körperachse, jedoch ohne das Auftreten einer Polaritätsumkehr in der Keimbahn (Abb. 15a-d, m). Zwar verhält sich die somatische Gründerzelle S1 wie bei *C. elegans* und teilt sich transvers zur anterior-posterioren Körperachse (Abb. 6c und 15e), jedoch ist die Zellteilungsabfolge in beiden Spezies unterschiedlich (Abb. 15m), so dass es zu einer linearen Anordnung der Zellen des Embryos von *A. nanus* kommt (Abb. 15c, d). Hierdurch unterbleibt ein Zell-Zell Kontakt zwischen P2 und S1p (Abb. 15c) und durch ein variables Zellarrangement in unterschiedlichen Embryonen kommt lediglich in etwa der Hälfte der untersuchten Individuen ein Zell-Zell Kontakt zwischen der Keimbahnzelle P3 und S1p zustande (Abb. 15e). Folglich kann weder die Keimbahnzelle P2 in *A. nanus* das Schicksal ABp in der Zelle S1p wie bei *C. elegans* induzieren noch kann ein solches Signal aufgrund einer heterochronen Verschiebung von der Keimbahnzelle P3 ausgehen.

Zellstammbaumanalysen und 3D-Rekonstruktionen zeigen, dass ähnlich wie für *C. elegans* beschrieben (Schnabel et al., 1997) die Zellzykluslängen und Teilungsfolgen in *A. nanus* zwischen einzelnen Individuen leicht variabel, jedoch die durchschnittlichen Zellteilungsabfolgen und Zellzykluslängen invariant sind (Abb. 15m). Die Zellzykluslängen sind für einzelne somatische Gründerzellen charakteristisch und es ist ein Gradient zwischen S1 (schnelle Zyklen) und S4 (langsame Zyklen) zu erkennen. Anders als bei *C. elegans* ist die durchschnittliche Zellzykluslänge der Keimbahn schneller als die ihrer somatischen Schwestern. Obwohl die frühe räumliche Musterbildung leicht variabel ist, münden alle beobachteten Embryonen in ein gleiches Muster mit einem Kontakt zwischen Darm und Keimbahn (Abb. 15f).

Die Gastrulation von *A. nanus* beginnt wie bei *C. elegans* mit der Einwanderung zweier Darmvorläuferzellen assoziiert mit der Keimbahn (Abb. 15f, n). Es kann kein Blastocoel, jedoch das Auftreten kleiner flüssigkeitsgefüllter Hohlräume beobachtet werden (Abb. 15h). Mesodermale Zellen wandern von der ventralen Körperseite unter Formation eines kleinen ovalen Blastoporus ein (Abb. 15j). Epidermale Zellen beginnen sich über die ventrale Seite des Embryos auszubreiten und den Blastoporus zu überwachsen (Epibolie; Abb. 15k). Mund und Anus werden wie bei *C. elegans* jeweils durch neue sekundäre Durchbrüche geschaffen (Abb. 15l).

Der Embryo von *A. nanus* ist bilateralsymmetrisch aufgebaut. Nachkommen der Gründerzellen S2, S3 und S4 ordnen sich rechts und links der Mittellinie an und tragen bilateralsymmetrisch zur Organogenese bei (nicht gezeigt). Die Symmetrie innerhalb der S1 Nachkommen wird jedoch durch die anteriore Verlagerung der S1al und S1pl gegenüber ihren rechten Schwesterzellen und deren Nachkommen gebrochen (Abb. 15n und 16).

Zellstammbaumanalysen und 3D-Rekonstruktionen zeigen, dass sich S1a und S1p in *A. nanus* unterscheiden und den Schicksalen und Regionen von ABa und ABp in *C. elegans* stark ähneln. So entsprechen sich die räumlichen Musterbildungen von S1a und S1p zwischen *A. nanus* und *C. elegans* zu einem hohen Grad (Abb. 5 und 16) und tragen bei beiden zu Nerven-, Pharynx- und Hypodermisstrukturen bei. Zell-Zell Kontakte welche bei *C. elegans* für die 3., 4. und 5. Induktion nötig sind (Abb. 4 und 5), finden sich auch bei *A. nanus* und könnten potentiell Induktionen ermöglichen (Abb. 16), um die bilaterale Symmetrie innerhalb der S1 Nachkommen sekundär wieder herzustellen.

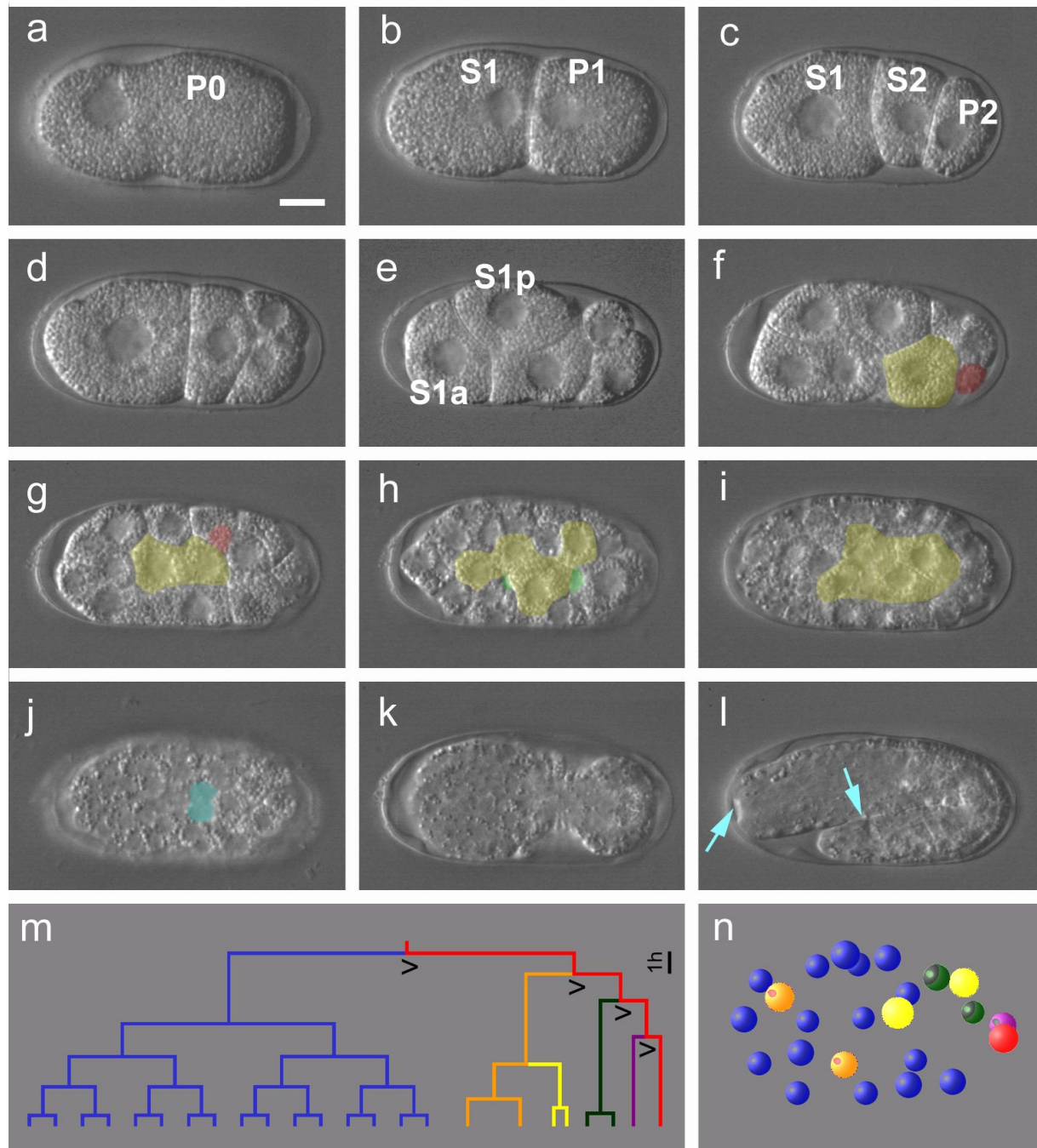


Abb. 15: Musterbildung, fehlende Polaritätsumkehr und Gastrulation von *A. nanus*

a-b) 1-Zell Stadium, P0 teilt sich longitudinal asymmetrisch. **b-e)** P1 teilt sich longitudinal asymmetrisch, S1 transvers symmetrisch, nur in einigen der beobachteten Embryonen kommt es zum Kontakt zwischen P2 und S1p. **f)** Die Darmvorläuferzelle S2p (gelb) markiert den ventralen Pol, Nachkommen von S1 definieren die links-rechts Körperachse. **g-i)** Gastrulationsbeginn, zwei Darmzellen gefolgt von P4 beginnen einzuwandern. Kein Blastocoel, nur einige kleinere flüssigkeitsgefüllte Hohlräume (hellgrün). **j)** Durch den sich formenden Blastoporus (türkis) wandern Zellen ein. **j-k)** Durch Epibolie wird der Blastoporus (türkis) überwachsen. **l)** Mund- und Anusöffnung entstehen durch einen neuen sekundären Durchbruch (hellblaue Pfeile). **m)** In einer Reihe von stammzellähnlichen asymmetrischen Zellteilungen entstehen die Gründerzellen S1 (blau), S2 (orange), S3 (dunkelgrün), S4 (lila) und P4 (rot) entlang der anterior-posterioren Körperachse. Keine Polaritätsumkehr, Zellzykluslängen und asymmetrische Zellteilungen (<>) sind eingezeichnet. **n)** 3D Kugelmodell des in m) dargestellten Zellstammbaumes. **Orientierung:** anterior links, a-f, l) linke Lateralansicht, g-k, n) Ventralansicht. **Eichstrich** 10µm.

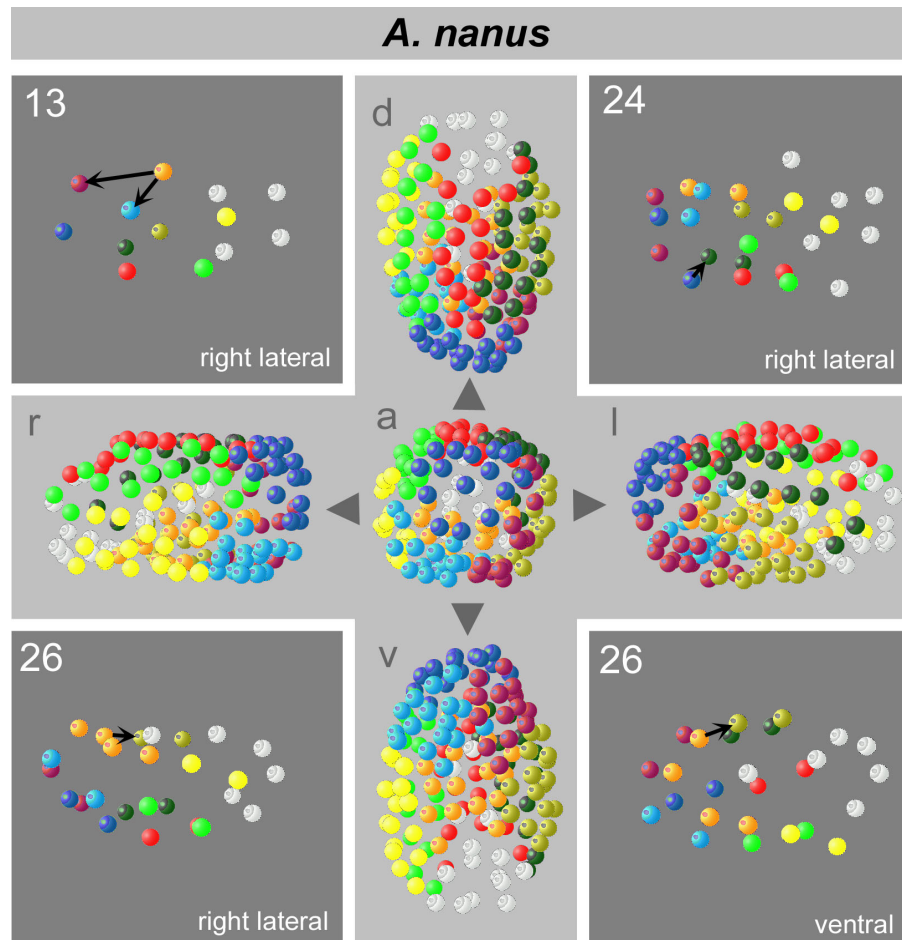


Abb. 16: Zellkontakte und Zellgruppierungen in *A. nanus*

Mit SIMI®-BIOCELL® rekonstruierte 3D-Kugelmodelle der Zellkernpositionen unterschiedlicher Embryonalstadien von *A. nanus*. Arrangement der Zellkerne zeigt für potentielle Zell-Zell Induktionen nötige Zellkontakte (schwarze Pfeile). Im 13-Zell Stadium berührt S2a (MS) die S1 Nachkommen S1ap und S1ara, im 24-Zell Stadium berührt S1alap die Zelle S1plaa und im 26-Zell Stadium berührt S2ap (MS) S1plpa. Nachkommen der acht S1 Zellen des 12-Zell Stadiums gruppieren sich in Regionen. Orientierung des 13, 24 und 26 Zellstadiums: anterior links. Orientierung des 128 S1-Stadiums: a) anteriore Ansicht, Drehung um 90° resultiert in einer (r) rechten, (l) linken, (d) dorsalen beziehungsweise (v) ventralen Ansicht des Kugelmodells, deren anteriore Pole zur Mitte ausgerichtet sind. **Farbcodierung:** s. Abb. 5.

4.1.3 Untersuchungen an *Acrobelloides* sp. (PS1146)

Wie in der Einleitung erwähnt, kann bei den Nematoda ein breites Spektrum an Fortpflanzungsmodi beobachtet werden. Die bisher beschriebenen Rhabditia *A. nanus* (Clade 11) und *D. coronatus* (Clade 9) vermehren sich parthenogenetisch. Mit *Acrobelloides* sp. (PS1146; Clade 11) wird ein sehr naher Verwandter von *A. nanus* untersucht, welcher sich wie *C. elegans* (Clade 9) hermaphroditisch fortpflanzt.

Anders als bei *C. elegans* und den bisher beschriebenen Vertretern der Rhabditia teilt sich die Keimzelle P0 von *Acrobelloides* sp. (PS1146) in zwei nahezu symmetrische Tochterzellen

(Abb. 17a, b). Sowohl S1 (nicht gezeigt) als auch P1 (Abb. 17b) scheinen sich allerdings transvers zu teilen ($n=3$), wobei sich P1 asymmetrisch teilt und aus der kleineren P2 die weitere Keimbahn hervorgeht (Abb. 17f). Ohne weiterführende zellbiologische Untersuchungen (z.B. Antikörperfärbungen der Teilungsspindeln) kann jedoch keine konkrete Aussage darüber getroffen werden, ob sich die Keimzellen in einer Reihe entlang der anterior-posterioren Körperachse teilen und ob eine Polaritätsumkehr auftritt. Diese Beobachtungen decken sich zwar mit denen von Ewald (2007), stehen aber im Widerspruch zu einer klaren longitudinalen Teilung der Keimbahn ohne Polaritätsumkehr, welche in den Arbeiten von Goldstein et al. (1998) und Badrinath und White (2003) abgebildet wird.

Trotz der Diskrepanzen in der räumlichen Anordnung der Zellen zwischen meinen und Lahls Beobachtungen auf der einen Seite und den angegebenen Literaturquellen unterbleibt aufgrund der zeitlichen Teilungsabfolge (Abb. 17m) ein Zell-Zell Kontakt zwischen P2 und S1p (Abb. 17c, d). Allerdings kommt es zu einem Kontakt von P4 und S1p, so dass zumindest eine Induktion durch die Keimbahn (jedoch nicht durch P2), welche das ABp Schicksal in S1p ähnlich wie bei *C. elegans* festlegt, nicht ausgeschlossen werden kann.

Anders als bei *C. elegans* ist die durchschnittliche Zellzykluslänge der Keimbahn schneller als die ihrer somatischen Schwestern. Obwohl die frühe räumliche Musterbildung leicht variabel ist, münden alle beobachteten Embryonen in ein gleiches Muster mit einem Kontakt zwischen Darm und Keimbahn (Abb. 17e).

Die Gastrulation von *Acrobeloides* sp. (PS1146) beginnt wie bei *C. elegans* mit der Einwanderung zweier Darmvorläuferzellen assoziiert mit der Keimbahn, jedoch hat sich P4 zu diesem Zeitpunkt bereits geteilt (Abb. 17f). Anders als bei *C. elegans* und den bisher beschriebenen Vertretern der Rhabditia ist zu Beginn der Gastrulation eine einlagige Blastula mit Blastocoel vorhanden (Abb. 17e-g). Auch die Blastoporusbildung variiert beträchtlich zu den bisher beschriebenen Spezies, so wandern mesodermale Zellen von der ventralen Körperseite unter Formation eines kleinen ovalen Blastoporus ein (Abb. 17h-i), welcher sich schlitzförmig über knapp 2/3 des Embryos auszudehnen beginnt (Abb. 17j), ausgehend von seiner Mitte von beiden Seiten her überwachsen wird (Abb. 17k) und sich in Richtung beider Pole zu schließen beginnt. Mund und Anus scheinen dabei anders als bei *C. elegans* jeweils als primärer Durchbruch erhalten zu bleiben (Abb. 17l).

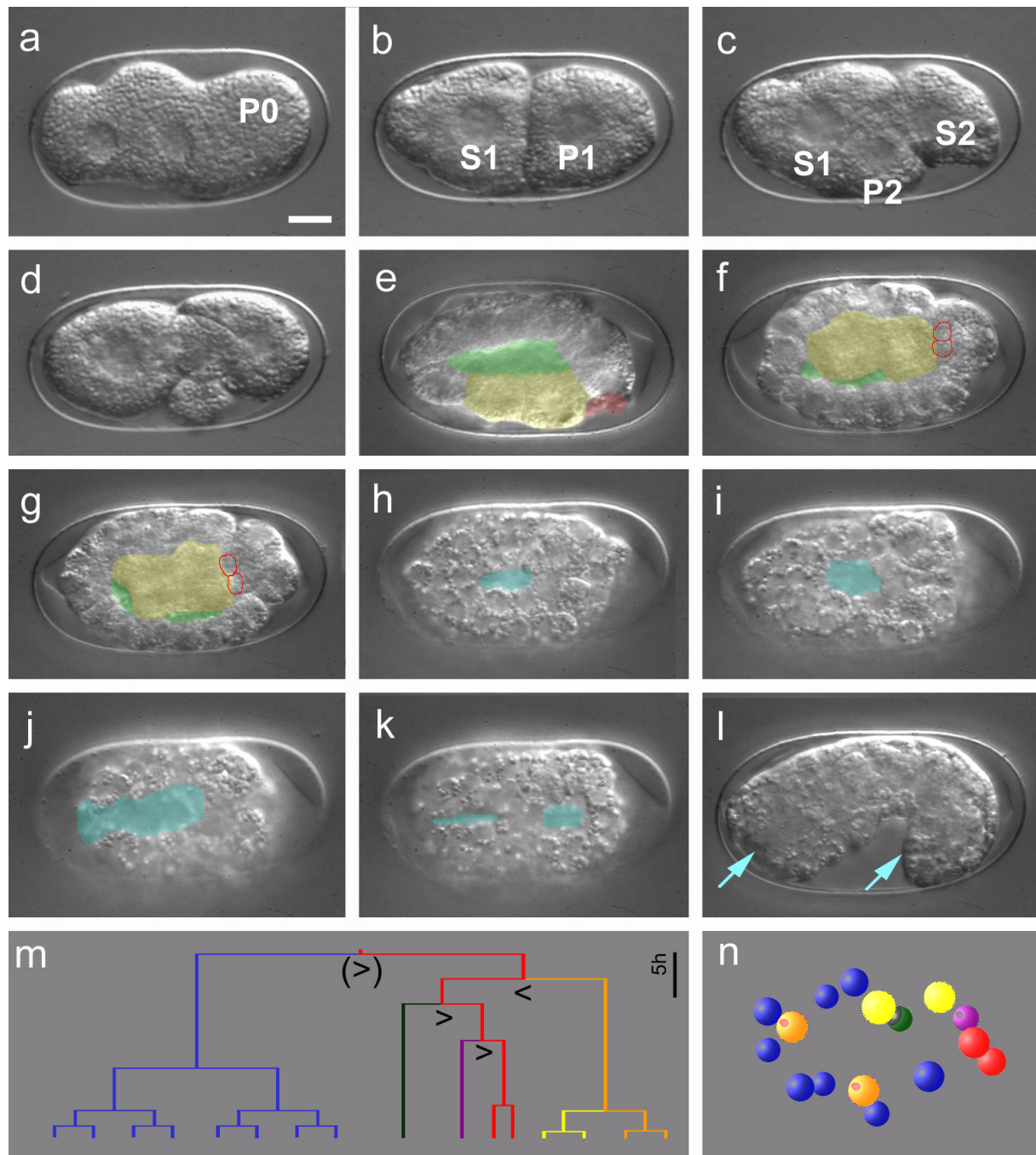


Abb. 17: Musterbildung, Polaritätsumkehr und Gastrulation von *Acrobelooides* sp. (PS1146)

a-b) Vorkernstadium, P0 teilt sich longitudinal symmetrisch. **b-d)** P1 teilt sich longitudinal asymmetrisch, S1 später transvers symmetrisch. **e)** Die Darmzellen S2pa und S2pp (gelb) markieren den ventralen Pol, Nachkommen von S1 definieren die links-rechts Körperachse. **e-g)** Gastrulationsbeginn, zwei Darmzellen gefolgt von den P4 Töchtern (rot; Z2+Z3) beginnen einzuwandern, es ist eine Blastula mit kompaktem Blastocoel (hellgrün) vorhanden. **h-k)** Der Blastoporus (türkis) zieht sich schlitzförmig entlang der anterior-posterioren Körperachse über 2/3 des Embryos, beginnt ausgehend von seiner Mitte sich reißverschlussartig nach außen zu schließen und zwei punktuelle Öffnungen bleiben erhalten. **l)** Mund- und Anusöffnung bleiben als primäre Durchbrüche erhalten (hellblaue Pfeile). **m)** In einer Reihe von stammzellähnlichen Zellteilungen entstehen die Gründerzellen S1 (blau), S2 (orange), S3 (dunkelgrün), S4 (lila) und P4 (rot) entlang der anterior-posterioren Körperachse. Polaritätsumkehr, Zellzykluslängen und asymmetrische Zellteilungen (<=>) sind eingezeichnet. **n)** 3D Kugelmodell des in m) dargestellten Zellstammbaumes. **Orientierung:** anterior links, a-e, l) linke Lateralansicht, f-k, n) Ventralansicht. **Eichstrich** 10µm.

Der Embryo von *Acrobelloides* sp. (PS1146) ist bilateralsymmetrisch aufgebaut. Nachkommen der Gründerzellen S2, S3 und S4 ordnen sich rechts und links der Mittellinie an und tragen bilateralsymmetrisch zur Organogenese bei (nicht gezeigt). Die Symmetrie innerhalb der S1 Nachkommen wird jedoch durch die anteriore Verlagerung der S1al und S1pl gegenüber ihren rechten Schwesterzellen und deren Nachkommen gebrochen (Abb. 17n und 18). Zell-Zell Kontakte welche bei *C. elegans* für die 3., 4. und 5. Induktion nötig sind, kommen zustande (Abb. 4 und 5) und könnten Induktionen bei *Acrobelloides* sp. (PS1146) ermöglichen (Abb. 18), um die bilaterale Symmetrie innerhalb der S1 Nachkommen sekundär wieder herzustellen.

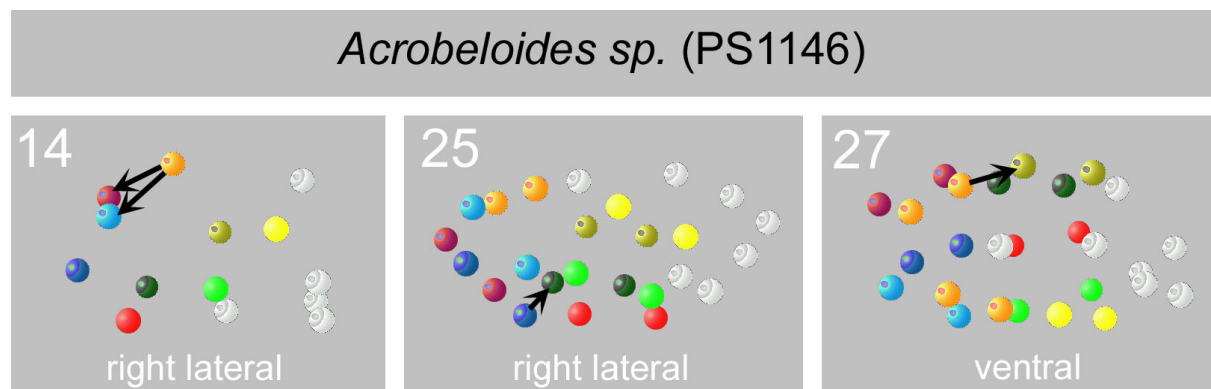


Abb. 18: Frühe Musterbildung der S1 Nachkommen von *Acrobelloides* sp. PS1146

Mit SIMI®-BIOCELL® rekonstruierte 3D-Kugelmodelle der Zellkernpositionen früher Embryonalstadien von *Acrobelloides* sp. (PS1146). Das Arrangement der Zellkerne zeigt für potentielle Zell-Zell Induktionen nötige Zellkontakte (schwarze Pfeile). Im 14-Zell Stadium berührt S2a (MS) die S1 Nachkommen S1alp und S1ara, im 25-Zell Stadium berührt S1alap die Zelle S1plaa und im 27-Zell Stadium berührt S2ap (MS) S1plpa. **Orientierung:** anterior links. **Farbcodierung:** s. Abb. 5.

4.1.4 Untersuchungen an *Panagrolaimus* sp. (ES444)

Bei *Panagrolaimus* sp. (ES444; Clade 10) handelt es sich um eine Spezies mit rhombusförmigem 4-Zell Stadium, welche phylogenetisch zwischen den oben beschriebenen parthenogenetischen Spezies *A. nanus* (Clade 11) und *D. coronatus* (Clade 9) steht.

Wie bei *C. elegans* teilen sich die Keimzellen stammzellartig asymmetrisch in einer Reihe entlang der anterior-posterioren Körperachse, und es kann eine Polaritätsumkehr in P2 beobachtet werden (Abb. 20a-d, m). Interessanterweise ist bei der Teilung von P1 die Tochterzelle S2 kleiner als P2 (Abb. 20b). Nichtsdestotrotz kommt es wie bei *C. elegans* zu einer rhombusförmigen Anordnung des 4-Zell Stadiums (Abb. 20c) und ein Zell-Zell Kontakt zwischen P2 und S1p besteht, so dass eine Induktion durch P2, welche das ABp Schicksal in S1p festlegt (Abb. 4), nicht ausgeschlossen werden kann.

Anders als bei *C. elegans* ist die durchschnittliche Zellzykluslänge der Keimbahn schneller als die ihrer somatischen Schwestern (Abb. 20m).

Die Gastrulation von *Panagrolaimus sp.* (ES444) beginnt wie bei *C. elegans* mit der Einwanderung zweier Darmvorläuferzellen assoziiert mit der Keimbahn (Abb. 20f), jedoch verbleibt P4 zuerst an der Oberfläche und wandert erst ein, nachdem weiteres mesodermales Gewebe eingewandert ist (Abb. 20h, i). Anders als bei *C. elegans*, allerdings ähnlich wie bei *Acrobelloides sp.* (PS1146), ist zu Beginn der Gastrulation von *Panagrolaimus sp.* (ES444) eine einlagige Blastula mit einem kleinem Blastocoel vorhanden (Abb. 20e, g und h). Auch die Blastoporusbildung von *Panagrolaimus sp.* (ES444) erinnert eher an *Acrobelloides sp.* (PS1146) als an *C. elegans*. So wandern mesodermale Zellen von der ventralen Körperseite unter Formation eines kleinen ovalen Blastoporus ein, welcher sich schlitzförmig über knapp 2/3 des Embryos auszudehnen beginnt (Abb. 20i), ausgehend von seiner Mitte von beiden Seiten her überwachsen wird (Abb. 20j) und sich in Richtung beider Pole zu schließen beginnt (Abb. 20k). Mund und Anus scheinen dabei anders als bei *C. elegans* jeweils als primärer Durchbruch erhalten zu bleiben (Abb. 20l).

Der Embryo von *Panagrolaimus sp.* (ES444) ist bilateralsymmetrisch aufgebaut. Nachkommen der Gründerzellen S2, S3 und S4 ordnen sich rechts und links der Mittellinie an und tragen bilateralsymmetrisch zur Organogenese bei (nicht gezeigt). Die Symmetrie innerhalb der S1 Nachkommen wird jedoch durch die anteriore Verlagerung der S1al und S1pl gegenüber ihren rechten Schwesterzellen und deren Nachkommen gebrochen (Abb. 20n und 19). Zell-Zell Kontakte welche bei *C. elegans* für die 3., 4. und 5. Induktion nötig sind, kommen zustande (Abb. 4 und 5) und könnten auch bei *Panagrolaimus sp.* (ES444) Induktionen ermöglichen (Abb. 19), um die bilaterale Symmetrie innerhalb der S1 Nachkommen sekundär wieder herzustellen.

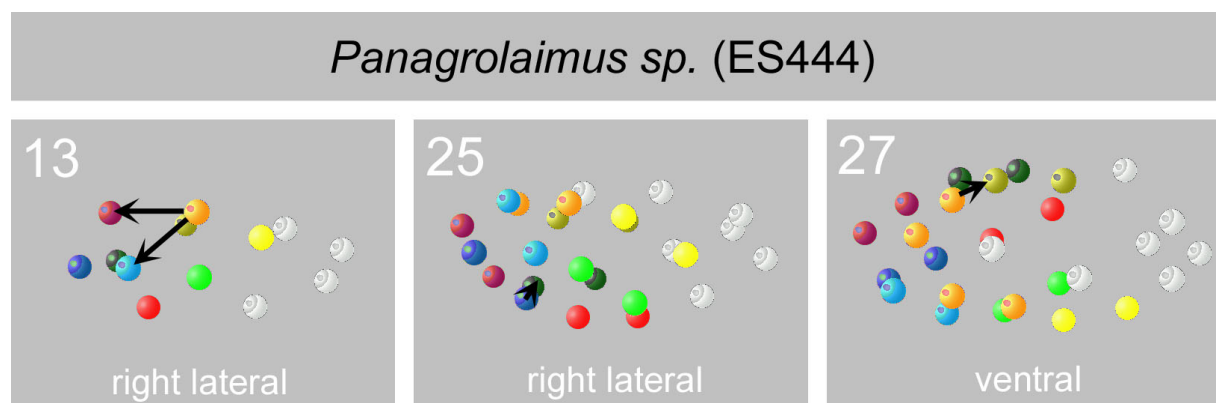


Abb. 19: Frühe Musterbildung der S1 Nachkommen von *Panagrolaimus sp.* (ES444)

Mit SIMI®-BIOCELL® rekonstruierte 3D-Kugelmodelle der Zellkernpositionen früher Embryonalstadien von *Panagrolaimus sp.* (PS444). Das Arrangement der Zellkerne zeigt für potentielle Zell-Zell Induktionen nötige Zellkontakte (schwarze Pfeile). Im 13-Zell Stadium berührt S2a (MS) die S1 Nachkommen S1alp und S1ara, im 25-Zell Stadium berührt S1alap die Zelle S1plaa und im 27-Zell Stadium berührt S2ap (MS) S1plpa. **Orientierung:** anterior links. **Farbcodierung:** s. Abb. 5.

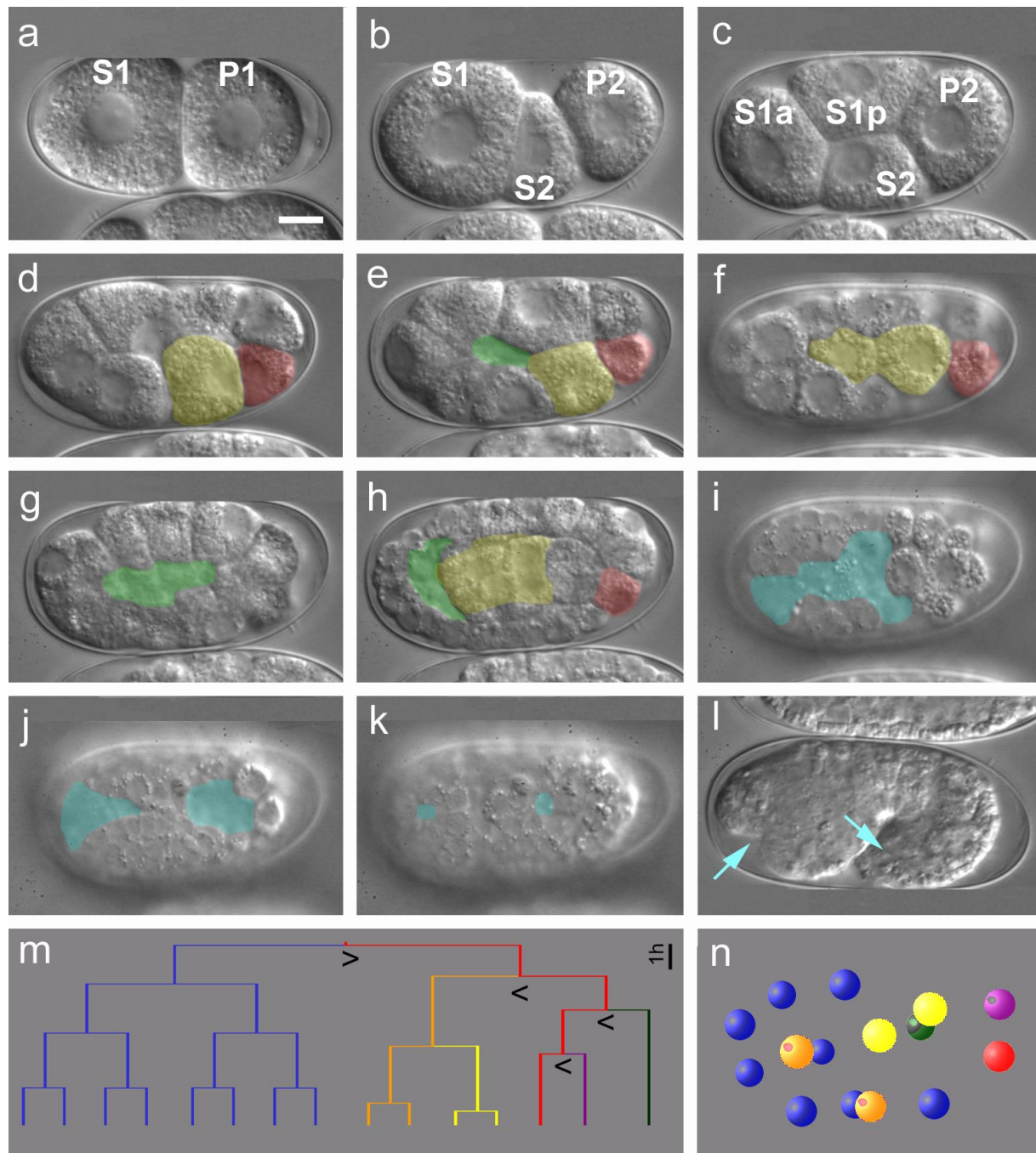


Abb. 20: Musterbildung, Polaritätsumkehr und Gastrulation von *Panagrolaimus sp.* (ES444)

a) Asymmetrisches 2-Zell Stadium. **b-c)** P1 teilt sich longitudinal asymmetrisch, wobei S2 kleiner ist als P2. S1 teilt sich transvers symmetrisch, es entsteht ein rhombusförmiges 4-Zell Stadium. **d)** Die Darmvorläuferzelle S2p (gelb) markiert den ventralen Pol, Nachkommen von S1 definieren die links-rechts Körperachse. **e-h)** Gastrulationsbeginn, zwei Darmzellen und verspätet P4 beginnen einzuwandern, es ist eine Blastula (hellgrün) mit kompaktem Blastocoel vorhanden. **i-k)** Der Blastoporus (türkis) zieht sich schlitzförmig entlang der anterior-posterioren Körperachse über 2/3 des Embryos, beginnt ausgehend von seiner Mitte sich reißverschlussartig nach außen zu schließen und zwei punktuelle Öffnungen bleiben erhalten. **l)** Mund- und Anusöffnung bleiben als primäre Durchbrüche erhalten (hellblaue Pfeile). **m)** In einer Reihe von stammzellähnlichen asymmetrischen Zellteilungen entstehen die Gründerzellen S1 (blau), S2 (orange), S3 (dunkelgrün), S4 (lila) und P4 (rot) entlang der anterior-posterioren Körperachse. Polaritätsumkehr in P2, Zellzykluslängen und asymmetrische Zellteilungen (<>) sind eingezeichnet. **n)** 3D Kugelmodell des in m) dargestellten Zellstammbaumes. **Orientierung:** anterior links, a-e, l) linke Lateralansicht, f-k, n) Ventralansicht. **Eichstrich** 10µm.

4.1.5 Schlussfolgerungen aus den Untersuchungen an den Rhabditia

Alle in dieser Arbeit untersuchten Vertreter der Rhabditia (Claden 7-12) weisen eine Trennung von Keimbahn und Soma auf, wobei die Keimbahn in einer Reihe stammzellartiger Teilungen somatische Gründerzellen entlang der Mittellinie abgibt und diese definiert. In allen Spezies kommt es zu einem Kontakt zwischen Keimbahn und Darmvorläuferzellen, entweder automatisch nach der Polaritätsumkehr in P2 oder nachdem die Keimbahnzellen bei Abwesenheit einer Polaritätsumkehr aktiv zur Darmvorläuferzelle gewandert sind. Ein solcher Kontakt wurde in vielen Organismen gefunden und scheint essentiell für die Normalentwicklung zu sein (Sulston et al., 1983; Wylie, 1999).

Die bei den beobachteten Vertretern der Rhabditia gefundenen Unterschiede in Zellteilungsrhythmen und Zellteilungsabfolgen lassen sich als heterochrone Verschiebungen im Lauf der Evolution erklären (Gould, 1977; Raff, 1996; Skiba und Schierenberg, 1992). Die beobachteten Variationen des Gastrulationsbeginns mit und ohne Beteiligung eines (rudimentären) Blastocoels lassen sich ebenfalls durch heterochrone Verschiebungen erklären. Eine mögliche Korrelation von Form und Größe des Eies, früher Musterbildung des Embryos, Blastocoel und letztendlich der Gonade und der Größe des Muttertieres sollten jedoch bedacht werden.

Zu Beginn der Embryonalentwicklung müssen nur wenige modulare Prozesse exakt ineinander greifen, somit ist Plastizität möglich, während in der Morphogenese eine exakte räumliche und zeitliche Kongruenz der ablaufenden Prozesse für eine Normalentwicklung nötig ist (Raff, 1996). Die in den verschiedenen Spezies beobachteten linearen und rhombusförmigen 4-Zell Stadien und Variationen der frühen Musterbildung können als solche frühe Plastizität angesehen werden. Und tatsächlich kommt es später bei allen Spezies trotz früher Unterschiede bezüglich Zellteilungsrhythmen, Zellteilungsabfolgen und Zellmusterbildungen zu einer sehr ähnlichen räumlichen Anordnung der Zellen im 12-Zell Stadium. Es kann eine anteriore Verschiebung der S1a Nachkommen gegenüber den S1p Nachkommen beobachtet werden, was zu einem Bruch in der bilateralen Symmetrie innerhalb von S1 führt. Zell-Zell Kontakte, welche bei *C. elegans* essentiell sind, um diese Symmetrie sekundär durch Induktionen wieder herzustellen (Schnabel und Priess, 1997), sind in allen untersuchten Spezies vorhanden. Besonders interessant ist es, dass die Nachkommen der Gründerzelle S1 sich in allen beobachteten Vertretern in acht Regionen (ala, alp, ara, arp, pla, plp, pra und prp) anordnen, welche sowohl innerhalb jeder untersuchten Spezies, als auch zwischen den verschiedenen Spezies sehr ähnlich angeordnet sind und möglicherweise für einen bei *C. elegans* schon postulierten „cell focusing“ Mechanismus (Bischoff und Schnabel, 2006; Schnabel et al., 2006) sprechen könnten. Die mit dieser Arbeit begonnenen 4D Analysen der Zellstammbäume sprechen bei allen hier untersuchten Spezies (Claden 9-11) für einen invarianten Zellstammbaum, welcher Voraussetzung für einen solchen Mechanismus wäre.

Die gefunden Variationen in der Blastoporusformation der untersuchten Spezies deuten auf größere modulare Modifikationen hin, welche sich nicht ohne weiteres mit einer frühen Plastizität, bei später Kongruenz (Raff, 1996), erklären lassen und muss weiter untersucht werden.

4.2 Untersuchungen an Vertretern der Chromadoria

Die Grenze zwischen Chromadoria und Rhabditia ist nicht klar abzustecken. Während die Plectida (Clade 6) morphologisch die nächsten Verwandten zu den Rhabditia (Claden 7-12) sind und den Chromadoria (Claden 3-6) zugeordnet werden (Chitwood und Chitwood, 1950), ist ihre phylogenetische Einordnung mittels SSU rDNA Analysen nicht eindeutig. Zwar handelt es sich bei den Plectida um eine monophyletische Gruppe, welche allerdings in Abhängigkeit vom mathematischen Verfahren zur Stammbaumerstellung entweder als eigenständiger Clade, als Gruppe innerhalb der Rhabditia oder als Schwestergruppe zu den Rhabditia aufgelöst wird (Holterman et al., 2006; Meldal et al., 2007). Auf der anderen Seite zeigen einleitende embryologische Untersuchungen an den Plectida trotz eines rhombusförmigen 4-Zell Stadiums, welches als ursprünglich für die Rhabditia angesehen wird (Dolinski et al., 2001), eine Reihe von Gemeinsamkeiten mit den Chromadoria auf, so dass die Plectida aus embryologischer Sicht sinnvollerweise den Chromadoria zugeordnet werden (Ewald, 2007; Lahl et al., 2003; Schierenberg, 2006; Schierenberg und Lahl, 2004). Um zu prüfen, ob sich S1a und S1p wie in *C. elegans* (Clade 9) und den oben beschriebenen Rhabditia unterschiedlich verhalten, Zellteilungsrythmen und exakte Zell-Zell-Kontakte kongruent sind und sich Zellgruppierungen („cell focusing“, siehe Einleitung; Bischoff und Schnabel, 2006; Schnabel et al., 2006) ausbilden, wurde mit der 4D-Analyse von *Plectus sp.* (ES601; Clade 6) begonnen.

4.2.1 Untersuchungen an *Plectus sp.* (ES601)

Der Embryo von *Plectus sp.* (ES601) ist mit einer Vitellinmembran, welche wiederum von einer Eischale umhüllt ist, umgeben und füllt diese nicht vollständig aus (Abb. 21a). Wie bei *C. elegans* teilen sich die Keimzellen stammzellartig asymmetrisch in einer Reihe entlang der anterior-posterioren Körperachse, und es kann eine Polaritätsumkehr in P2 beobachtet werden (Abb. 21a-e, m). Die frühe Musterbildung erscheint sehr variabel, so teilt sich die Zelle S1 in der Mehrzahl der beobachteten Embryonen (9 von 11) wie bei *C. elegans* transvers zur anterior-posterioren Körperachse und es entsteht ein T-förmiges Übergangsstadium (Abb. 21c), welches in das typische rhombusförmige 4-Zell Stadium übergeht (Abb. 21d). Jedoch teilen sich in wenigen Embryonen (2 von 11) sowohl S1 als

auch P1 in longitudinaler Ausrichtung (nicht gezeigt). Nichtsdestotrotz kommt es wie bei *C. elegans* zu einer rhombusförmigen Anordnung des 4-Zell Stadiums (Abb. 21d) und ein Zell-Zell Kontakt zwischen P2 und S1p besteht, so dass eine Induktion durch P2, welche das ABp Schicksal in S1p festlegt (Abb. 4), in keiner der Varianten ausgeschlossen werden kann. Wie bei *C. elegans* ist die durchschnittliche Zellzykluslänge der Keimbahn langsamer als die ihrer somatischen Schwestern (Abb. 21m).

Die Gastrulation von *Plectus sp.* (ES601) beginnt anders als bei *C. elegans* und den in dieser Arbeit beschriebenen Rhabditia mit der Einwanderung einer einzelnen Darmvorläuferzelle assoziiert mit der Keimbahn (Abb. 21f). Es können dabei jedoch weder ein Blastocoel noch sichtbare flüssigkeitsgefüllte Hohlräume beobachtet werden (Abb. 21). Die Blastoporusbildung von *Plectus sp.* (ES601) erinnert eher an die von *Acrobelloides sp.* (PS1146) oder *Panagrolaimus sp.* (ES444) als an *C. elegans*. So wandern mesodermale Zellen von der ventralen Körperseite unter Formation eines kleinen ovalen Blastoporus ein, welcher sich schlitzförmig über knapp 2/3 des Embryos auszudehnen beginnt (Abb. 21h, i), ausgehend von seiner Mitte von beiden Seiten her überwachsen wird (Abb. 21j) und sich in Richtung beider Pole zu schließen beginnt (Abb. 21k). Mund und Anus scheinen dabei anders als bei *C. elegans* jeweils als primärer Durchbruch erhalten zu bleiben (Abb. 21l).

Der Embryo von *Plectus sp.* (ES601) ist schon früh bilateralsymmetrisch aufgebaut (Lahl et al., 2003; Abb. 21n). Nachkommen der Gründerzellen S2, S3 und S4 ordnen sich rechts und links der Mittellinie an und tragen bilateralsymmetrisch zur Organogenese bei (nicht gezeigt). Anders als bei *C. elegans* und in der die *Plectiden* beschreibenden Literatur (Ewald, 2007; Lahl et al., 2003) sind die S1 Nachkommen jedoch nicht bilateralsymmetrisch zueinander aufgebaut. Darüber hinaus ist die frühe Musterbildung im Embryo von *Plectus sp.* (ES601) äußerst variabel und 3D-Rekonstruktionen (Abb. 22 und 23) zeigen, dass zwar Zellregionen ähnlich wie bei *C. elegans* (Abb. 5) gebildet werden, deren räumliche Anordnung zueinander innerhalb der Spezies auch gleich sind, jedoch jeweils von unterschiedliche Nachkommen der S1 gebildet werden. So definieren „ala“, „pra“ und „prp“ in den drei dargestellten Embryonen jeweils drei verschiedene Regionen und „alp“, „ara“, „arp“, „pla“ und „plp“ jeweils zwei verschiedene Regionen (Abb. 22).

Zell-Zell Kontakte, welche bei *C. elegans* für die 3., 4. und 5. Induktion nötig sind (Abb. 4 und 5), kommen bei *Plectus sp.* (ES601) nicht zum Tragen (Abb. 23). So berührt MS in *Plectus sp.* (ES601) zwei für eine potentielle 3. Induktion kompetente Zellpaare („ala“ und „alp“ sowie „ara“ und „arp“), wohingegen MS bei *C. elegans* nur jeweils eine Zelle der beiden kompetenten Zellpaare berührt („alp“ und „ara“), um eine binäre Entscheidung zwischen ansonsten identischen Zellschicksalen herbeizuführen (Abb. 4). Das Ganze wird bei *Plectus sp.* (ES601) durch seine äußerst variable frühe Musterbildung verkompliziert (Abb.

22), so dass potentielle Induktionspartner von MS diese in einigen Embryonen überhaupt nicht berühren. Vorläufige Zellstammbaumanalysen (nicht gezeigt) deuten darauf hin, dass Zellschicksale bei *Plectus sp.* (ES601) positionsabhängig sind. So stammen Hypodermis und Pharynxzellen immer von den gleichen embryonalen Regionen ab, auch wenn diese in verschiedenen Embryonen von unterschiedlichen S1 Nachkommen gebildet werden. Zum Beispiel scheint der Pharynx in Embryo #3 (Abb. 22 und 23) unter anderem durch zelluläre Beiträge von „ala“, „alp“, „ara“ sowie „pla“, in Embryo #2 jedoch durch Beiträge von „alp“, „ara“, „arp“ sowie „pla“ und in Embryo #1 durch Beiträge von „ala“, „alp“, „arp“ sowie „prp“ gebildet zu werden.

Dadurch, dass in unterschiedlichen Embryonen die embryonalen Regionen durch unterschiedliche S1 Nachkommen definiert werden (Abb. 22) und Nachkommen von S1a und S1p teilweise in den gleichen Regionen anzutreffen sind, kann eine Induktion zwischen S1p und P2, um das ABp Schicksal wie in *C. elegans* (Abb. 4) zu definieren, ausgeschlossen werden. Darüber hinaus deuten meine bisherigen Beobachtungen darauf hin, dass *Plectus sp.* (ES601) keinen invarianten Zellstammbaum wie *C. elegans* besitzt, sondern eher einen positionsabhängigen Mechanismus zur Determinierung von Zellschicksalen.

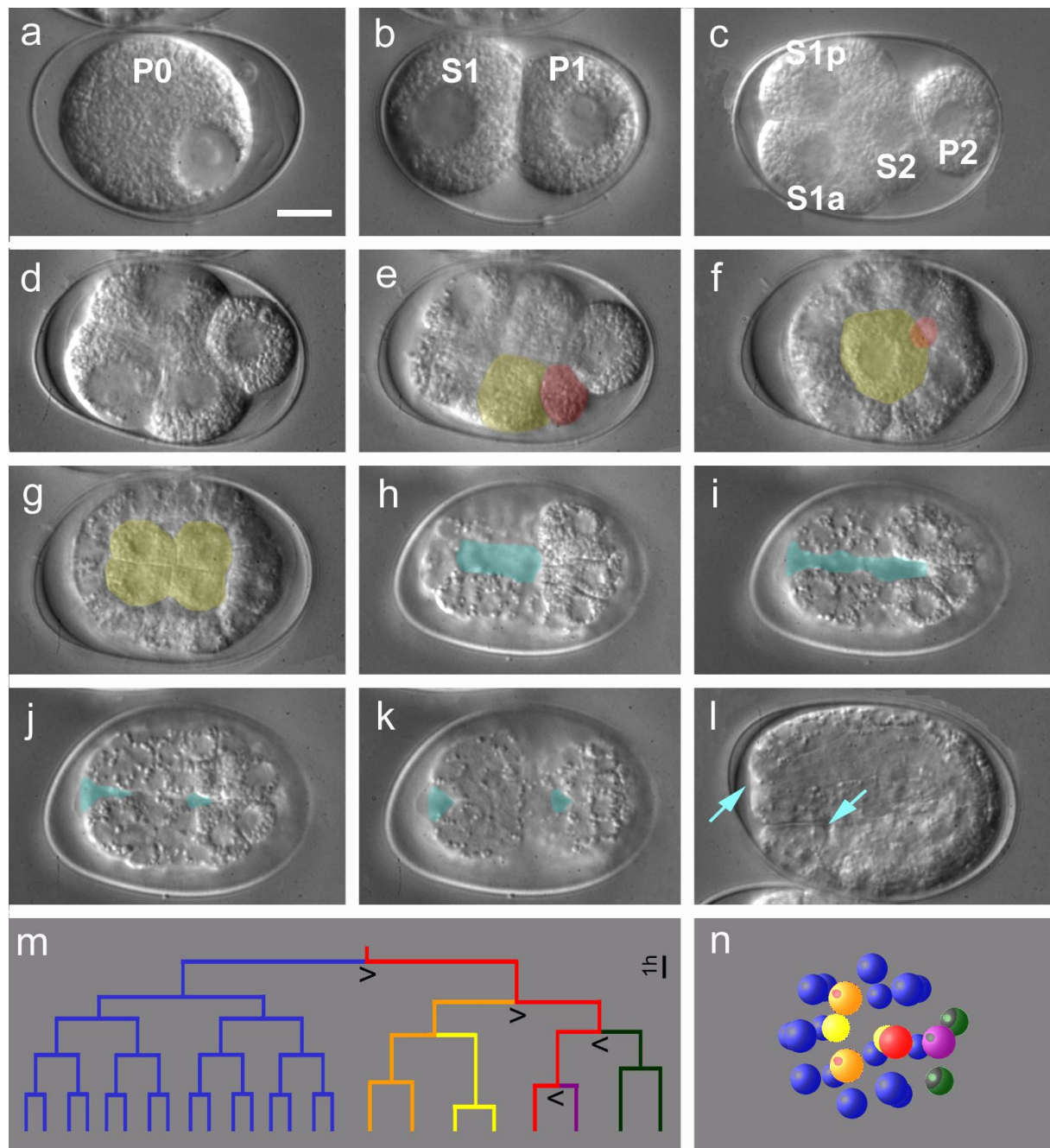


Abb. 21: Musterbildung, Polaritätsumkehr und Gastrulation von *Plectus sp.* (ES601)

a-b) 1-Zell Stadium, P0 teilt sich longitudinal asymmetrisch. **b-d)** P1 teilt sich longitudinal asymmetrisch, S1 transvers symmetrisch, es entsteht ein rhombusförmiges 4-Zell Stadium. **e)** Die Darmvorläuferzelle S2p (gelb) markiert den ventralen Pol, Nachkommen von S1 definieren die links-rechts Körperachse. **e-g)** Gastrulationsbeginn, eine Darmzelle gefolgt von P4 beginnt einzuwandern, es ist kein Blastocoel vorhanden. **h-k)** Der Blastoporus (türkis) zieht sich schlitzförmig entlang der anterior-posterioren Körperachse über 2/3 des Embryos, beginnt ausgehend von seiner Mitte sich reißverschlussartig nach außen zu schließen und zwei punktuelle Öffnungen bleiben erhalten. **l)** Mund- und Anusöffnung bleiben als primäre Durchbrüche erhalten (hellblaue Pfeile). **m)** In einer Reihe von stammzellähnlichen Zellteilungen entstehen die Gründerzellen S1 (blau), S2 (orange), S3 (dunkelgrün), S4 (violett) und P4 (rot) entlang der anterior-posterioren Körperachse. Polaritätsumkehr in P2, Zellzykluslängen und asymmetrische Zellteilungen (<=>) sind eingezeichnet. **n)** 3D Kugelmodell des in m) dargestellten Zellstammbaumes. **Orientierung:** anterior links, a-e, l) linke Lateralansicht, f-k, n) Ventralansicht. **Eichstrich** 10µm.

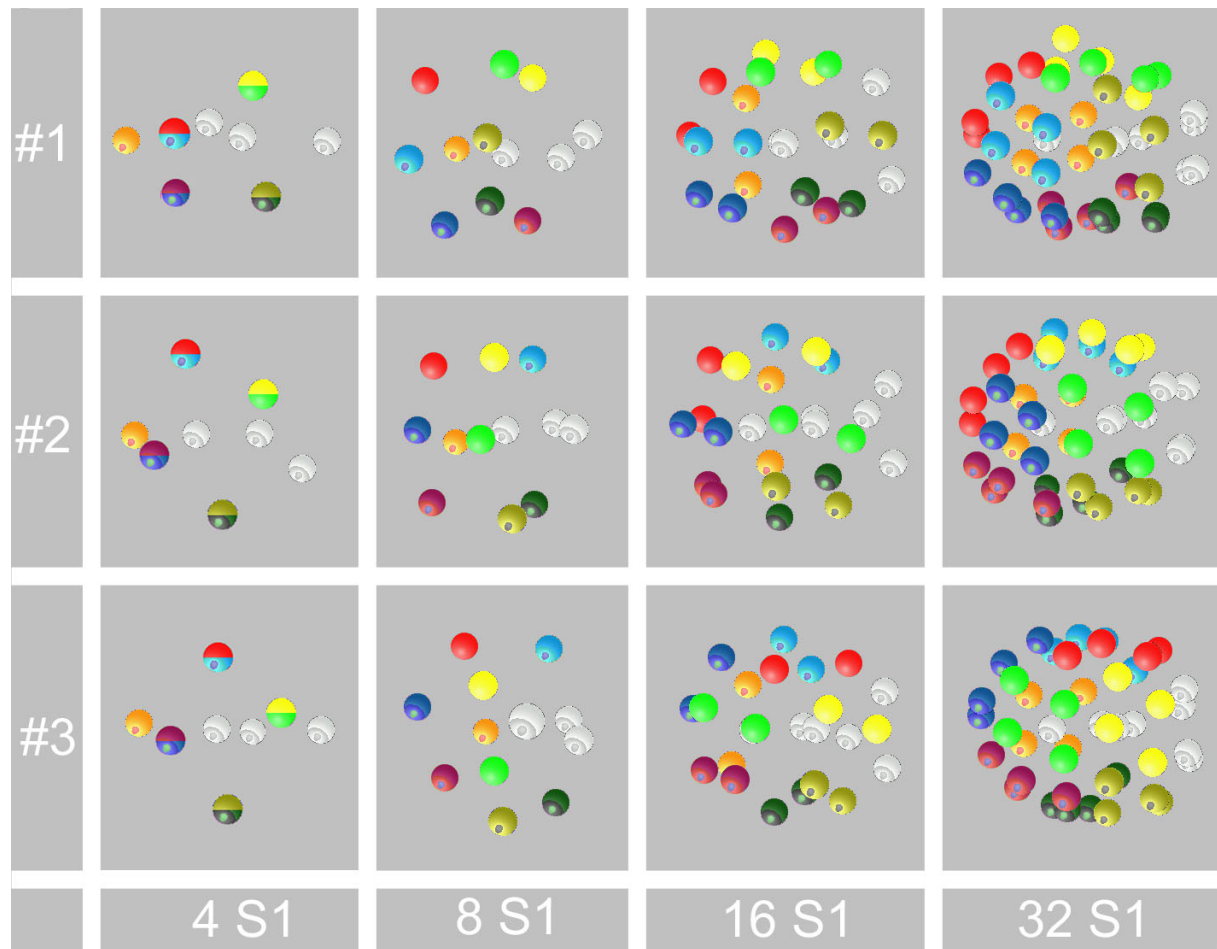


Abb. 22: Variabilität der Zellgruppierungen bei *Plectus sp.* (ES601)

Mit SIMI®-BIOCELL® rekonstruierte 3D-Kugelmodelle der Zellkernpositionen früher Embryonalstadien von *Plectus sp.* (ES601). Die Orientierung der frühen Zellteilungen ist in den gezeigten Embryonen äußerst variabel (4-, 8- und 16 S1) und es werden keine aktiven Zellwanderungen zur Korrektur in ein einheitliches Muster beobachtet. Der Vergleich des Zellarrangements der Zellkerne dreier Embryonen zeigt, dass Zellregionen (32 S1-Stadium) ähnlich wie bei *C. elegans* (Abb. 5) gebildet werden, deren räumliche Anordnung zueinander innerhalb dieser Spezies auch gleich ist, welche jedoch jeweils von unterschiedlichen Nachkommen der S1 gebildet werden. „ala“, „pra“ und „prp“ definieren jeweils drei verschiedene Regionen und „alp“, „ara“, „arp“, „pla“ und „plp“ jeweils zwei verschiedene Regionen. **Orientierung:** anterior links, Dorsalansicht. **Farbcodierung:** s. Abb. 5.

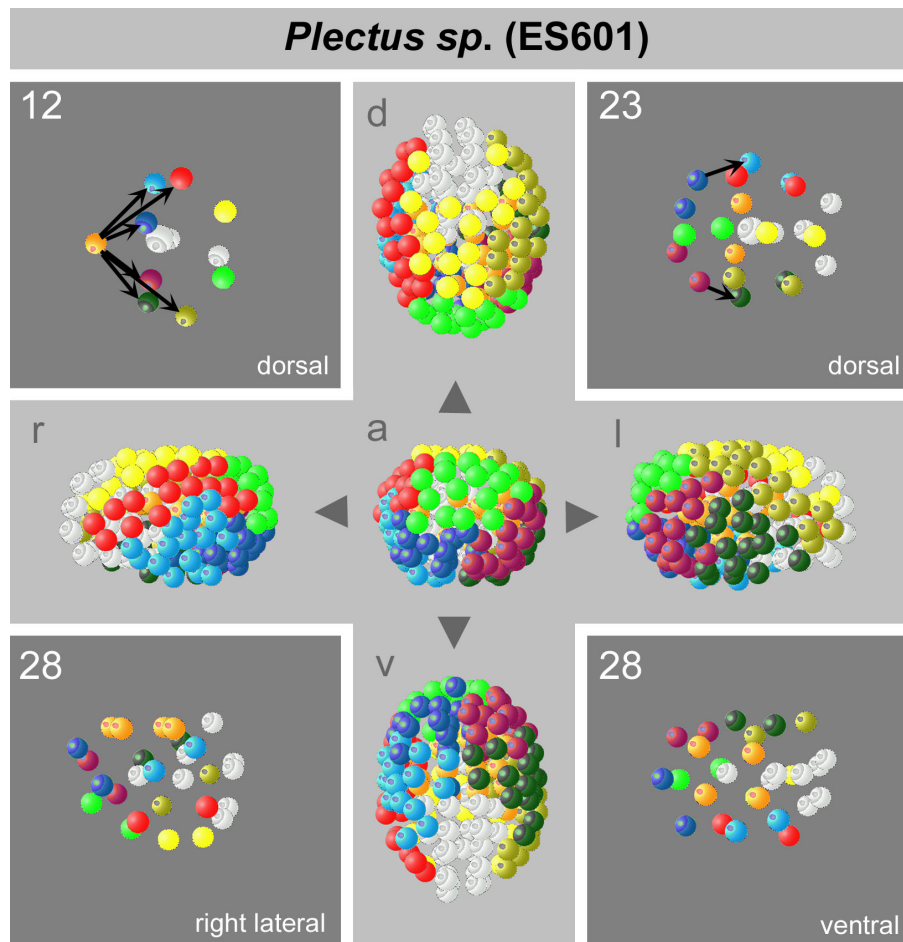


Abb. 23: Zellkontakte und Zellgruppierungen in *Plectus sp.* (ES601)

Mit SIMI®-BIOCELL® rekonstruierte 3D-Kugelmodelle der Zellkernpositionen unterschiedlicher Embryonalstadien von *Plectus sp.* (ES601). Die **schwarzen Pfeile** zeigen sämtliche S1 Nachkommen des Embryo #3, welche durch MS berührt werden und somit analog zu *C. elegans* induziert werden könnten. Im dargestellten 12-Zell Stadium von Embryo #3 (Abb. 22) berührt S2a (MS) die S1 Nachkommen S1ala, S1alp, S1ara, S1arp, S1pla und S1plp. S1ala und S1alp sind durch eine rechts-links Teilung entstanden, liegen beide anterior. Nachkommen der acht S1 Zellen des 12-Zell Stadiums gruppieren sich in Regionen. Orientierung des 12, 23 und 28 Zellstadiums: anterior links. Orientierung des 128 S1-Stadiums: a) anteriore Ansicht, Drehung um 90° resultiert in einer (r) rechten, (l) linken, (d) dorsalen beziehungsweise (v) ventralen Ansicht des Kugelmodells, deren anteriore Pole zur Mitte ausgerichtet sind. **Farbcodierung:** s. Abb. 5.

4.2.2 Schlussfolgerungen aus den Untersuchungen an den Chromadoria

Plectus sp. (PS601; Clade 6) weist wie die in dieser Arbeit untersuchten Vertreter der Rhabditia (Claden 7-12) eine Trennung von Keimbahn und Soma auf, wobei die Keimbahn in einer Reihe stammzellartiger Teilungen somatische Gründerzellen entlang der Mittellinie abgibt und diese definiert. Durch die auftretende Polaritätsumkehr in P2 kommt es automatisch zu einem für die Normalentwicklung essentiellen Kontakt zwischen Darmvorläuferzelle und Keimbahn (Sulston et al., 1983; Wylie, 1999). Die im Vergleich zu den Rhabditia gefundenen Unterschiede in Zellteilungsrythmen und Zellteilungsabfolgen sowie die beobachtete Gastrulation ohne Beteiligung eines sichtbaren Blastocoels lassen sich durch heterochrone Verschiebungen im Lauf der Evolution erklären (Raff, 1996).

Besonders interessant sind die Beobachtungen, dass zwar acht embryonale Regionen („ala“, „alp“, „ara“, „arp“, „pla“, „plp“, „pra“ und „prp“) von den Nachkommen der S1 gebildet werden, welches stark an den in *C. elegans* postulierten Mechanismus des „cell focusing“ (Einleitung; Bischoff und Schnabel, 2006; Schnabel et al., 2006) erinnert, diese Regionen aber in unterschiedlichen Embryonen durch unterschiedliche Nachkommen von S1 gebildet werden. Da die bisherigen Beobachtungen darauf hindeuten, dass *Plectus sp.* (ES601) keinen invarianten Zellstammbaum wie *C. elegans* besitzt, sondern eher einen positionsabhängigen Mechanismus zur Determinierung von Zellschicksalen, fehlt der tragende Grundpfeiler der „cell focusing“ Hypothese, nämlich dass Zellen sich aufgrund ihres Schicksals sortieren. Vielmehr scheint es so, als würden sich in *Plectus sp.* (ES601) erst die Regionen bilden und später die Schicksale.

Die hier neu gewonnenen Erkenntnisse an *Plectus sp.* (ES601) bestätigen die bisherigen auf embryologischen (Ewald, 2007; Lahl et al., 2003; Schierenberg, 2006; Schierenberg und Lahl, 2004) und morphologischen (Chitwood und Chitwood, 1950) Daten beruhende Einordnung der Plectida zu den Chromadoria (Claden 3-6). Die Abwesenheit eines invarianten Zellstammbaumes und die Übereinstimmung von embryologischen Gemeinsamkeiten mit den Chromadoria, wie z.B. der Gastrulationsbeginn mit einer Darmzelle, sprechen gegen die Einordnung der monophyletischen Plectida als Schwestergruppe oder Teilgruppe der Rhabditia, sondern eher als eigenständigen Clade (Abb. 8; Holterman et al. 2006).

4.3 Untersuchungen an *Romanormis culicivorax*

Es gibt nur wenige Arbeiten, welche sich mit embryologischen Fragestellungen innerhalb der Enoplea beschäftigen. Diese zeigen jedoch die Abstammung des Darms von der Gründerzelle S1 (Malakhov, 1994), die Abwesenheit eines Zellstammbaumes (Voronov, 1999; Voronov und Panchin, 1998) oder das Auftreten einer Gastrulation unter Beteiligung eines großen Blastocoels (Schierenberg, 2005). Dies alles sind Eigenschaften, die bei dem Modellorganismus *C. elegans* nicht auftreten, obwohl er in der Fachliteratur als repräsentativ für das gesamte Taxon der Nematoda gilt.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Suche und Etablierung eines geeigneten repräsentativen Modellorganismus innerhalb der Enoplea. Hierfür wurden verschiedene Kandidaten innerhalb der *Enoplida*, *Triplonchida*, *Dorylaimida*, *Mononchida*, *Mermithida* und *Trichinellida* untersucht. Kriterien wie Laborhaltung, Lebenszyklus, Generationszeit, Humanpathogenität und letztendlich die Transparenz der Eier für mikroskopische Untersuchungen waren wichtig.

Ausschlaggebend für die Wahl von *Romanormis culicivorax* war neben den aufgelisteten Punkten jedoch ein in den Nematoda bisher vollkommen unbeschriebenes Phänomen, die asymmetrische Segregation von farbigen zytoplasmatischen Komponenten in spezifische Zellen.

4.3.1 Keimbahn-Soma Trennung

C. elegans zeigt eine klare frühe Trennung von Keimbahn und Soma. Die Keimbahn gibt in einer Reihe stammzellartiger, asymmetrischer Teilungen somatische Gründerzellen entlang der anterior-posterioren Körperachse ab (Deppe et al., 1978; Schierenberg, 2004).

Gibt es in *R. culicivorax* eine frühe Trennung in Keimbahn- und Somazellen und ist eine entsprechende Nomenklatur gerechtfertigt?

Bei *R. culicivorax* sind die Tochterzellen von P0 in Bezug auf das Zellvolumen in etwa symmetrisch (Kapitel 4.3.6), was nicht für eine typische Keimbahn-Soma Trennung spricht. Jedoch wird eine bisher für Nematoden unbeschriebene asymmetrische Segregation farbiger zytoplasmatischer Komponenten (Kapitel 4.3.2) in die posteriore Tochterzelle beobachtet. Diese teilt sich in Folge dreimal hintereinander asymmetrisch entlang der anterior-posterioren Körperachse, jeweils in eine große und eine kleine Zelle (Kapitel 4.3.6) und mit der 4. Teilung in zwei gleichgroße Tochterzellen. Beide wandern im Rahmen der Gastrulation zusammen mit den Darmvorläuferzellen ins Innere des Embryos ein (Kapitel 4.3.12). Dieses Gastrulationsverhalten und die Serie asymmetrischer Zellteilungen entlang der anterior-posterioren Körperachse entsprechen dem Keimbahnverhalten von *C. elegans*.

Diese Beobachtungen, zusammen mit den später dargestellten Zellstammbaumanalysen (Kapitel 4.3.10) unterstreichen, dass auch in *R. culicivora* eine Trennung von Keimbahn und Soma stattfindet. Deswegen wurden die Zellen analog zu *C. elegans* nach der S-Nomenklatur (Kapitel 1.1) mit S1-S4 und P1-P4 benannt.

4.3.2 Asymmetrische zytoplasmatische Segregation einer braunen Farbkomponente

Ein prominentes bisher unbeschriebenes Phänomen für das Taxon Nematoda ist die asymmetrische Segregation von farbigen Zytoplasmakomponenten, wie sie in *R. culicivora* angetroffen werden.

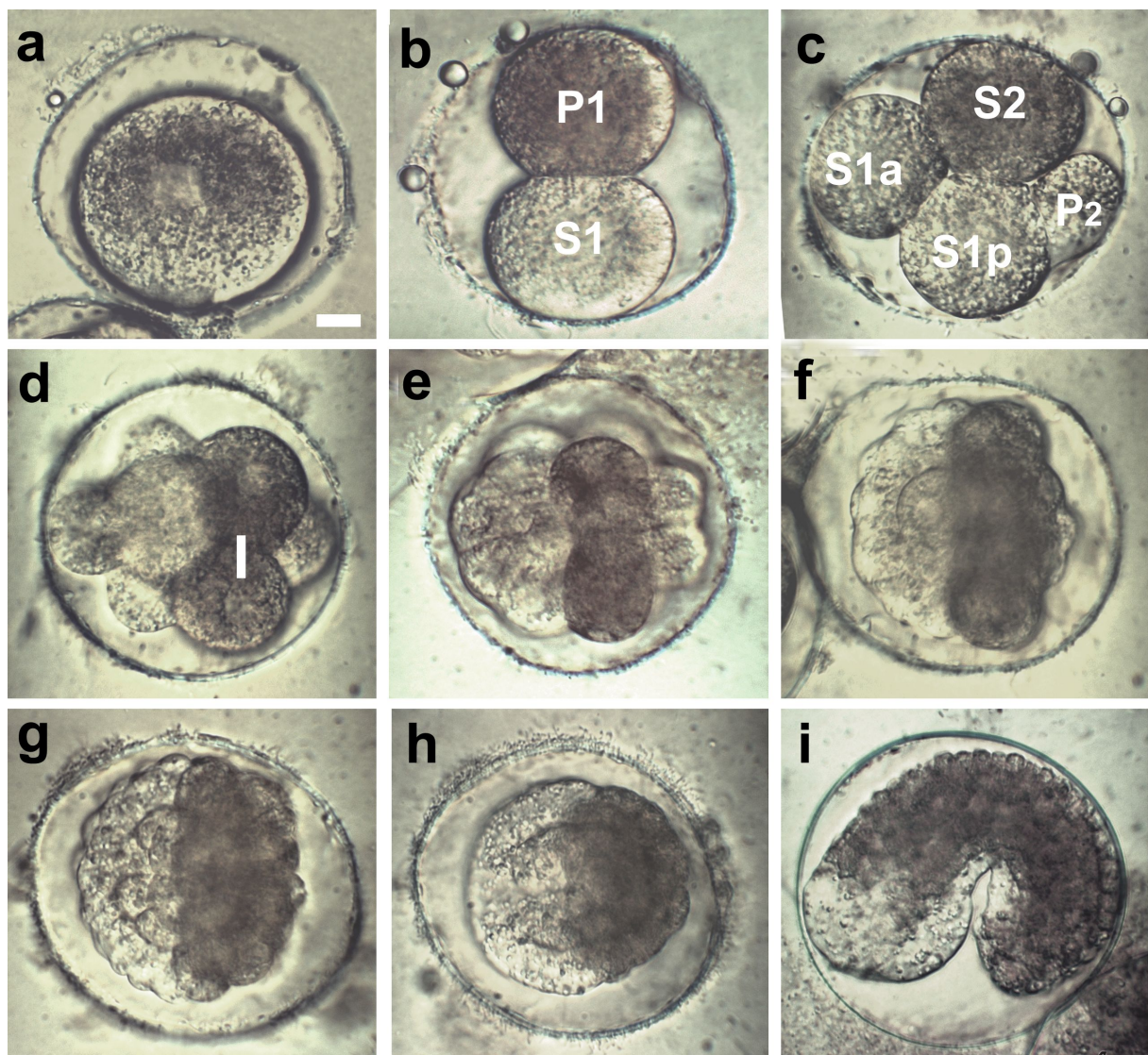


Abb. 24: Segregation einer braunen Farbkomponente in *R. culicivora*

a) Vor der ersten Teilung reichert sich ursprünglich gleichmäßig verteiltes, braunes Zytoplasma am posterioren Pol der P0 an. **b)** Mit Teilung von P0 liegt es asymmetrisch zum größten Teil in P1. **c)** Mit Teilung der P1 liegt es asymmetrisch zum größten Teil in S2, wird dann gleichmäßig unter den **d)** 2, **e)** 8, **f)** 16, **h-i)** allen Tochterzellen der Gründerzelle S2 verteilt, welche zur Hypodermis beitragen. **Orientierung:** a+b) posterior oben, c-i) anterior links c, i) linke Lateralansicht, d-h) Dorsalansicht. **Eichstrich:** 10µm.

Nach der Eiablage ist eine braune Farbkomponente zuerst gleichmäßig in P0 verteilt, segregiert jedoch vor der ersten Teilung zum posterioren Pol der Zelle (Abb. 24a). Diese Farbsegregation demonstriert eine Zellpolarität in P0, trotz symmetrischer Teilung in Bezug auf das Zellvolumen. Im 2-Zell Stadium ist die Farbkomponente in P1 zu finden (Abb. 24b), wo sie mit der nächsten Teilung asymmetrisch an S2 verteilt wird (Abb. 24c). Dabei kommt es jedoch immer wieder vor, dass kleine Mengen des farbigen Zytoplasmas in S1 oder P1 verbleiben. Mit der transversen Teilung der S2 wird die Farbkomponente dann gleichmäßig auf alle Nachkommen der S2 verteilt (Abb. 24d-i). Zellen mit brauner Farbkomponente erstrecken sich später über große Teile des Embryos und tragen zur Hypodermis bei (Abb. 24i).

Diese Beobachtungen zeigen, dass eine zytoplasmatische Segregation entlang der anterior-posterioren Körperachse in frühen Teilungen stattfindet.

Weitere Untersuchungen wurden durchgeführt, um zu prüfen, ob mit dieser asymmetrischen Verteilung der Farbkomponente eine Determination bestimmter Schicksale einhergeht. Darüber hinaus ist nicht offensichtlich, ob in *R. culicivora* ähnlich wie in *C. elegans* eine asymmetrische Verteilung von keimbahnspezifischen Strukturen (P-Granula; Strome und Wood, 1983) zu finden ist. Erstere Frage wird in Kapitel 4.3.3 angesprochen, letztere in Kapitel 4.3.5.

4.3.3 Normalentwicklung nach experimenteller Fehlverteilung der Farbkomponente

Die Segregation der braunen Farbkomponente (Kapitel 4.3.2) erinnert an die asymmetrische Verteilung zytoplasmatischer Komponenten, wie die der P-Granula (Strome und Wood, 1983) in *C. elegans* oder des Myoplasmas (Conklin, 1905; Jeffery und Swalla, 1997) in *Ascidien*. In *C. elegans* geht die asymmetrische Verteilung mit der Aufrechterhaltung des Keimbahnschicksals einher, in *Ascidien* führt eine Fehlverteilung zu zusätzlichen Muskelzellen (Nishida, 1992; Whittaker, 1983).

Um zu testen, ob das Pigment eine ähnliche determinierende Funktion in *R. culicivora* ausübt, wurden Zentrifugationsexperimente mit 1-Zell Stadien durchgeführt.

Diese Zentrifugationen führten zu einer Auftrennung zytoplasmatischer Komponenten in drei Schichten, ähnlich wie bei Experimenten in *C. elegans* (Schlicht und Schierenberg, 1991), wobei die braune Farbkomponente am zentripetalen Pol zum liegen kommt (Abb. 26a).

In Abhängigkeit von der Orientierung des Eies relativ zur Zentrifugalkraft können verschiedene Muster der abnormalen Translokationen beobachtet werden, wobei drei Hauptmuster auftreten (Abb. 25A-C):

Steht die Teilungsebene senkrecht zur zytoplasmatischen Schichtung, gelangt in beide Tochterzellen etwa die gleiche Menge der Farbkomponente (n=36; Abb. 25a und 26b). Mit der folgenden Teilungsrunde segregiert sie in die Zellen S1p und S2 (Abb. 25a' und 26c).

Steht die Teilungsebene parallel zur zytoplasmatischen Schichtung und die Farbkomponente liegt am posterioren Pol, gelangt sie in die Zelle P1 (n=7; Abb. 25b). Mit der folgenden Teilungsrunde segregiert sie normalerweise in die Zelle S2 (Abb. 25b').

Steht die Teilungsebene parallel zur zytoplasmatischen Schichtung und die Farbkomponente liegt am anterioren Pol, gelangt sie in die Zelle S1p (n=11; Abb. 25c). Mit der folgenden Teilungsrunde segregiert sie normalerweise in die Zelle S1p (Abb. 25c' und 26d).

In seltenen Fällen kann nach der Zentrifugation eine Verteilung der zytoplasmatischen Farbkomponente auf S1a (n=3) oder auf beide Tochterzellen der S1 (n=4; Abb. 26f) beobachtet werden.

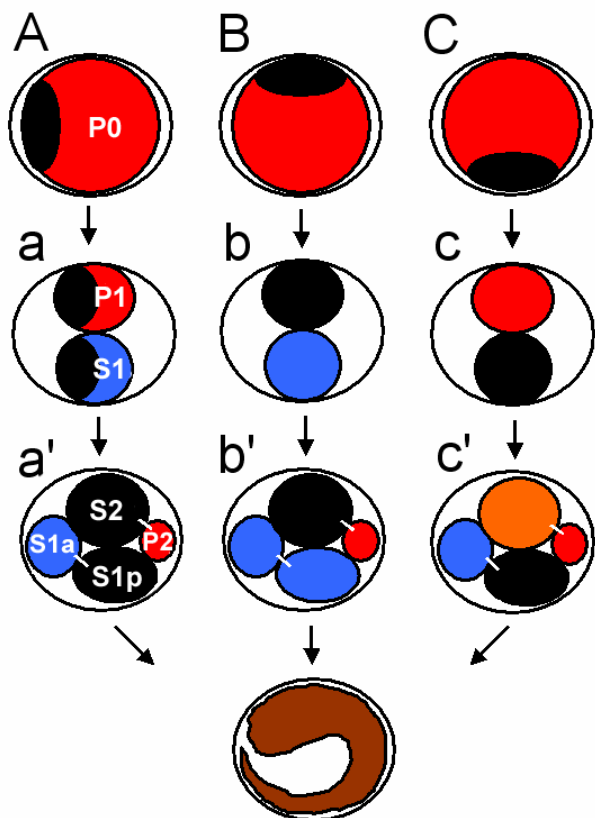


Abb. 25: Die drei häufigsten nach der Zentrifugation auftretenden Muster

A-C) Die Zentrifugation von 1-Zell Stadien von *R. culicivora* führt zur Akkumulation des braunen Zytoplasmas (schwarze Kappen), welches in Abhängigkeit der Orientierung der folgenden Zellteilung ausserhalb der Zentrifuge entweder **a)** in S1 und P1, **b)** ausschließlich in P1 oder **c)** ausschließlich in S1 zum liegen kommt. Mit der nächsten Teilung gelangt das braune Zytoplasma in die Zellen **a')** S1p und S2, **b')** S2, bzw. **c')** S1p. Alle Varianten führen zu einer normalen weiteren Entwicklung.

Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung nach der Zentrifugation geben die markierten Zellen S1a, S1p und S2 die Farbkomponente unterschiedlich an ihre Töchter weiter und markieren so invariant spezifische Gruppen von Zellen. Dabei durchlaufen alle manipulierten Embryonen normale Musterbildung und Zellteilungsfolgen wie in unbehandelten Embryonen: Die Farbkomponente der markierten S2 Zellen wird, wie im unbehandelten Wildtyp, gleichmäßig an ihre Tochterzellen weitergegeben und markiert im weiteren Verlauf der Entwicklung Hypodermis- und Körpermuskelstrukturen (Abb. 24c-i).

Die Farbkomponente der markierten S1a Zellen (n=7) wird gleichmäßig unter deren Tochterzellen verteilt und markiert im weiteren Verlauf der Entwicklung neuronale Strukturen.

Die Farbkomponente der markierten S1p Zellen (n=15) wird hauptsächlich an S1pp weitergegeben und markiert im weiteren Verlauf der Entwicklung Pharynx- und Darmstrukturen (Abb. 26d, g-i).

Alle auftretenden Embryonen mit einer abnormalen Verteilung der Farbkomponente können sich zu normal bewegenden Jungtieren innerhalb der Eischale entwickeln.

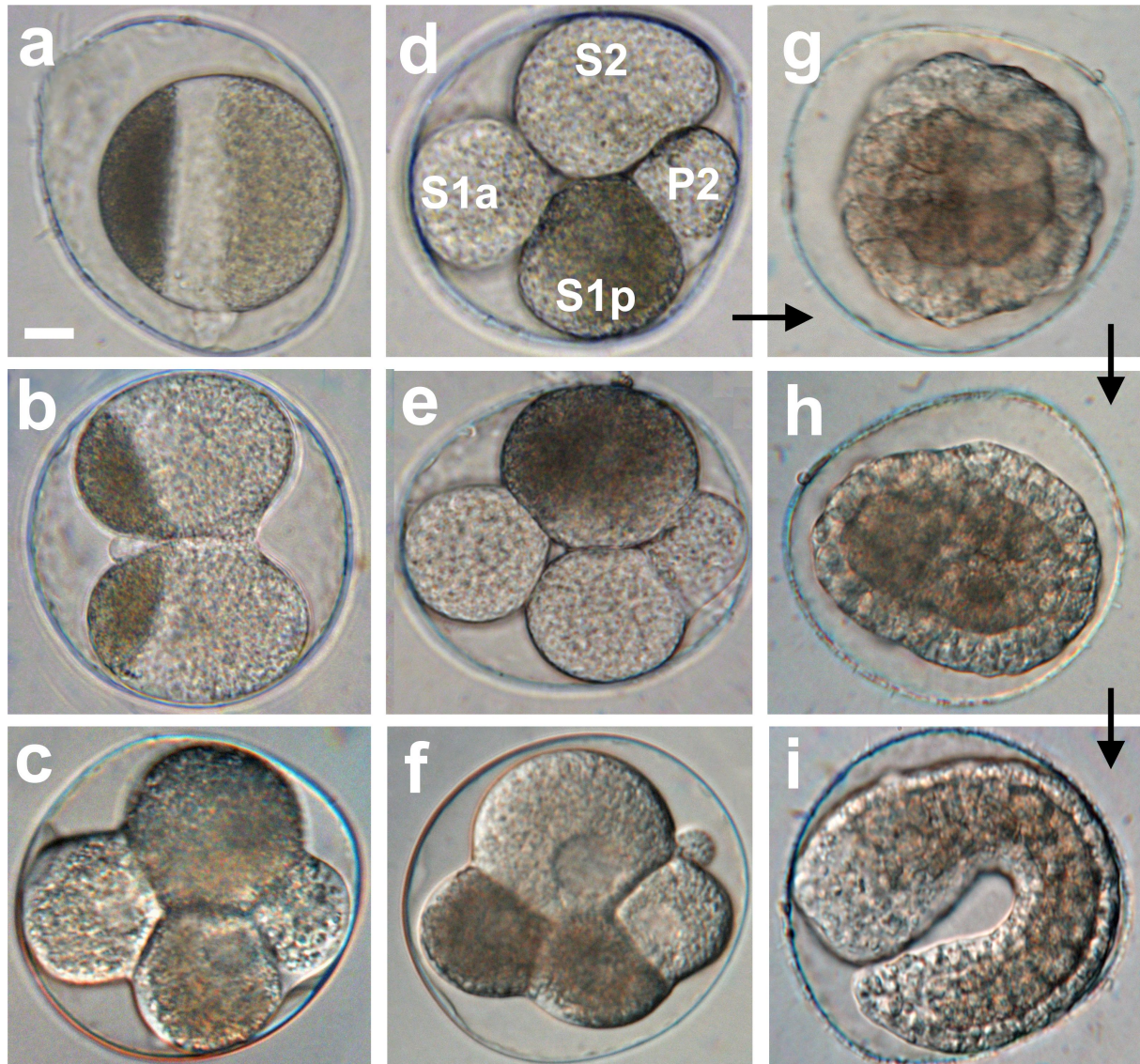


Abb. 26: Segregation des braunen Zytoplasmas nach Zentrifugation

a) Während der Zentrifugation der 1-Zell Stadien trennen sich die zytoplasmatischen Komponenten in drei Schichten auf. **b,d,e)** Die drei häufigsten Verteilungsmuster (Abb. 25A-C). **a,b,c)** Durch die Teilung wird das zentrifugierte braune Zytoplasma gleichmäßig auf P1 und S1 verteilt und bei der anschließenden Teilung asymmetrisch auf deren Tochterzellen S2 und S1p. **a,d,g,h,i)** Das braune Zytoplasma gelangt asymmetrisch über S1 und S1p in die Zelle S1pp, welche zu Darm und Pharynxstrukturen beiträgt. **e)** Das braune Zytoplasma gelangt in S2 und verhält sich wie im unzentrifugierten Wildtyp (Abb. 24c-i). **f)** In seltenen Fällen gelangt das braune Zytoplasma in beide S1 Tochterzellen. **Orientierung:** a+b) posterior oben, c-f,i) anterior links, dorsal oben, g+h) anterior links, Ventralsicht. **Eichstrich:** 10µm.

Diese Beobachtungen lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

- a) Die Farbkomponente ist keine Determinante, ihre Fehlverteilung führt zur normalen Musterbildung und Entwicklung.
- b) Die asymmetrische Verteilung der Farbkomponente erfolgt nur in frühen anterior-posterior ausgerichteten Teilungen (P0, P1, S1p, S1pp).
- c) Die Farbkomponente eignet sich als Marker für Zellstammbaumanalysen.
- d) Darm und Pharynx stammen von S1p ab.

4.3.4 Die Farbkomponente als möglicher Sonnenschutz

Nachdem eine experimentelle Fehlverteilung der Farbkomponente keine determinierende Wirkung auf die Embryonalentwicklung hat (Kapitel 4.2.3), bleibt die Frage ihrer Funktion offen. In Amphibien kann eine Ansammlung von Melanin am animalen Pol der Oocyte beobachtet werden, welches im Laufe der Entwicklung in der Hypodermis zum liegen kommt und als möglicher Schutz vor UV-Strahlung beschrieben wird (Duellman und Trueb, 1986).

Um zu testen, ob es sich bei der braunen Farbkomponente in *R. culicivora* um Melanin handelt, wurden zwei histologische Färbemethoden [„Eisenmethode“ und die „Argentaffine Reaktion“, nach Romeis (1989)] an Paraffinschnitten adulter Tiere, mit Oocyten in den Gonaden, angefertigt.

Sowohl die „Eisenmethode“ als auch die „Argentaffine Reaktion“ (Abb. 27) fielen positiv aus, so dass es sich bei der braunen Farbkomponente vermutlich um Melanin handelt.

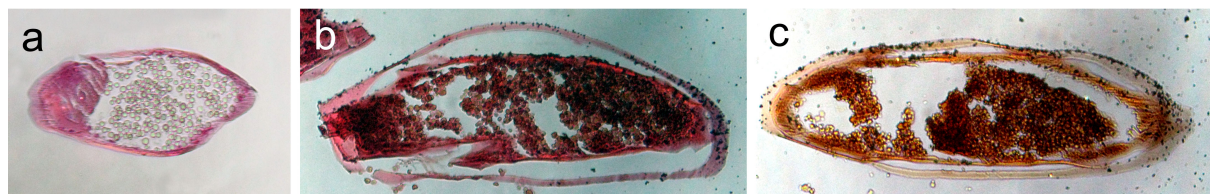


Abb. 27: Argentaffine Reaktion zum Nachweis von Melanin

12µm dicke Längsschnitte durch *R. culicivora*. **a)** Unbehandelte Kontrolle mit Kernechtrot gegengefärbt, Muskulatur, Hypodermis und Kutikula erscheinen rot. **b)** Durch die Argentaffine Reaktion erscheinen Hypodermis und Granula zum Teil braun-schwarz gefärbt, mit Kernechtrot gegengefärbt. **c)** Argentaffine Reaktion, ohne Gegenfärbung mit Kernechtrot wird die Färbung der Hypodermis besser sichtbar.

Weitere Untersuchungen, z.B. mittels HPLC, sollten diesen Befund jedoch absichern. Die Zellstammbaumanalysen (Kapitel 4.3.10) zeigen, dass das Melanin in der normalen Embryogenese von *R. culicivora* zum größten Teil in die spätere Hypodermis gelangt und legen eine Funktion als Sonnenschutz nahe. Dies erscheint sinnvoll, zumal der Präparasit bis zu zwei Tage knapp unter der Wasseroberfläche auf seine Wirte lauert.

4.3.5 Segregation cytoplasmatischer Komponenten

In *C. elegans* tritt eine frühe asymmetrische Verteilung keimbahnspezifischer zytoplasmatischer Komponenten, der so genannten P-Granula, auf (Strome und Wood, 1983). Ihre genaue Funktion ist bis heute ungeklärt, jedoch geht mit ihnen das Keimbahnschicksal einher und ihre Fehlverteilung führt zum Verlust des Keimbahnschicksals (Strome et al., 1995). Auch in anderen nahen Verwandten von *C. elegans* konnten diese Strukturen bereits mit Antikörpern nachgewiesen werden (Skiba und Schierenberg, 1992, Schierenberg, persönliche Mitteilung). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass die P-Granula in Keimzellen nahe den Kernmembranporen liegen (Krieg et al., 1978; Wolf et al., 1983).

Um das Vorkommen dieser keimbahnspezifischen Strukturen auch in *R. culicivora* zu untersuchen, wurden vier monoklonale Antikörper (Strome und Wood, 1983), welche in *C. elegans* die P-Granula erkennen, getestet.

Keiner der vier getesteten Antikörper markiert selektiv die prominenten Keimbahnstrukturen (P-Granula), stattdessen markierten die Antikörper K76 und L416 granuläre Strukturen innerhalb aller Zellkerne während der gesamten Embryogenese (Abb. 28). Dabei tendieren diese Strukturen dazu, während der Frühentwicklung kleiner und häufiger aufzutreten. Vorläufige Untersuchungen mit DNA- und RNA-Fluoreszenzmarkern deuten auf eine Kolokalisation der Antikörperfärbung mit Orten der RNA-Synthese hin. In den DIC Aufnahmen können jedoch keine prominenten Nucleoli ausgemacht werden.

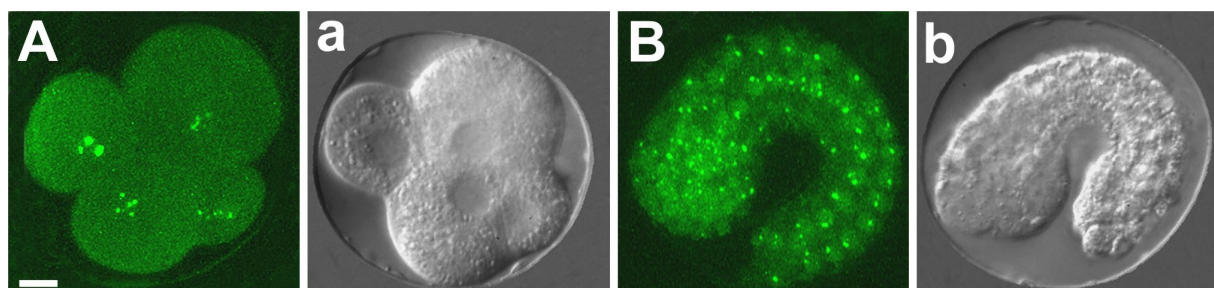


Abb. 28: P-Granula Färbungen markieren Kernkomponenten in *R. culicivora*

A) Alle Kerne des 4-Zell Stadiums sind mit mehreren kleinen Granula markiert. **B)** Alle Kerne des dargestellten Morphogenesestadiums sind mit nur einem oder wenigen Granula markiert. A und B) Computerrekonstruierte LSM Aufnahmen von L416 P-Granula Antikörperfärbungen, a und b) sind DIC Aufnahmen gleicher Stadien. **Orientierung:** anterior links, Lateralansicht. **Eichstrich:** 10µm

Um das Vorkommen von Nucleoli und P-Granula in *R. culicivora* weiter zu untersuchen, wurde mit der elektronenmikroskopischen Untersuchung früher Embryonalstadien begonnen. Die ersten Analysen zeigen elektronendichte Strukturen in den Interphasekernen der untersuchten frühen Stadien, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um die mit den Antikörpern K76 und L416 markierten potentiellen Nukleoli handelt (Abb. 29a, b). Darüber

hinaus können in der Keimbahn nicht membranumgrenzte granuläre Strukturen erkannt werden, welche um den Interphasenkern der P2 liegen. Ausschnittsvergrößerungen aus Keimbahnzellen zeigen, dass diese Strukturen in der Interphase nahe den Kernporen (Abb. 29c, d) und während der Mitosephase nahe der verbliebenen Kernmembran (Abb. 30) liegen.

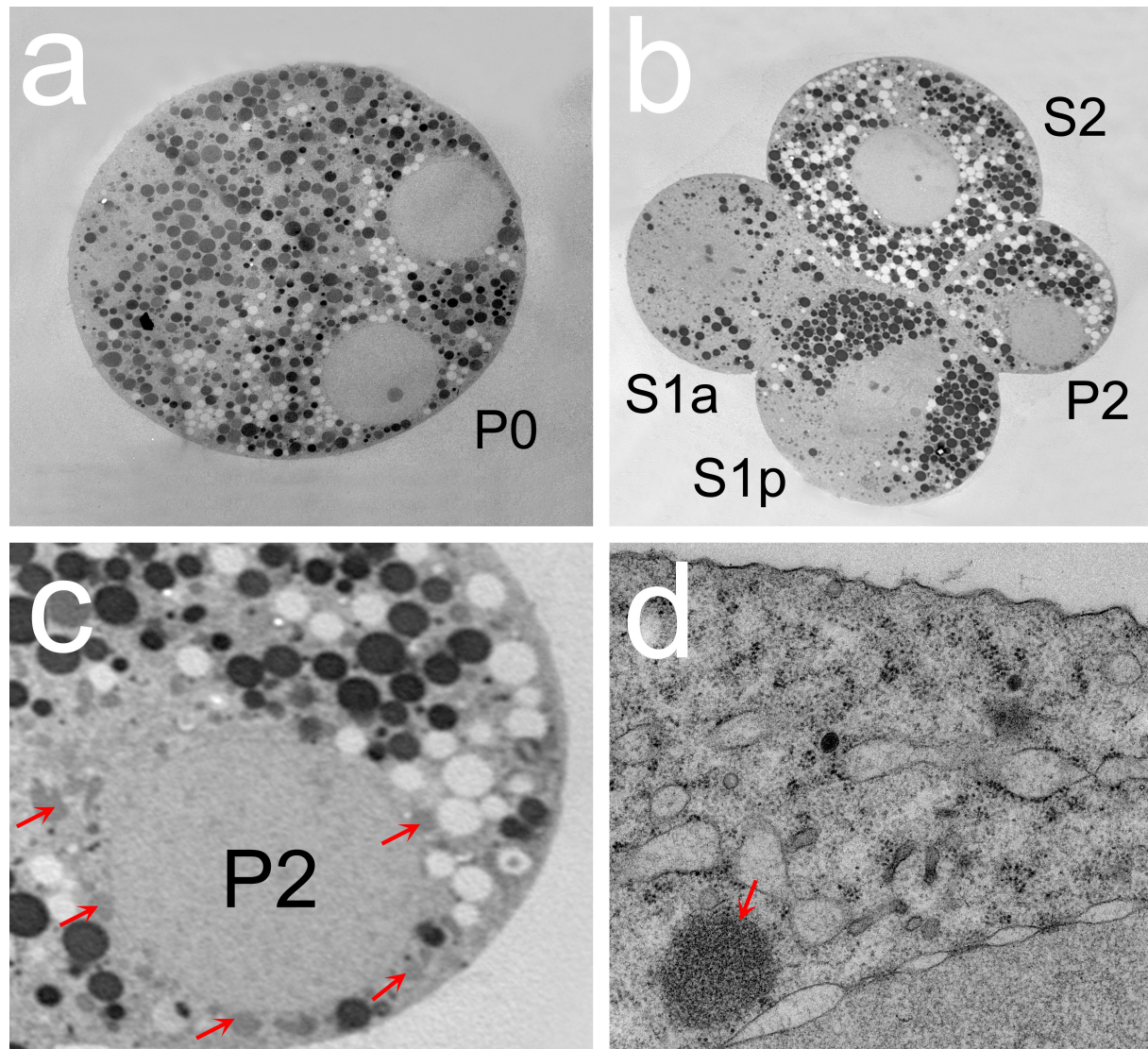


Abb. 29: EM-Schnitte durch frühe Stadien von *R. culicivorax*

a) Vorkernstadium mit asymmetrischer Granulaverteilung und Nucleolus in einem der beiden Vorkerne. **b)** 4-Zell Stadium mit asymmetrischer Granulaverteilung, Teilungsspindel und kondensierte Chromosomen in S1a und S1p, Interphasenkerne in P2 und S2 sowie Nucleolus im Kern von S2. **c)** Um den Interphasenkern von P2 sind nicht membranumgrenzte Strukturen sichtbar (Pfeile). **d)** Ausschnittsvergrößerungen der Keimbahn zeigen eine dieser nicht membranumgrenzte Strukturen (Pfeil) nahe an den Kernporen, umgeben von rauem ER.

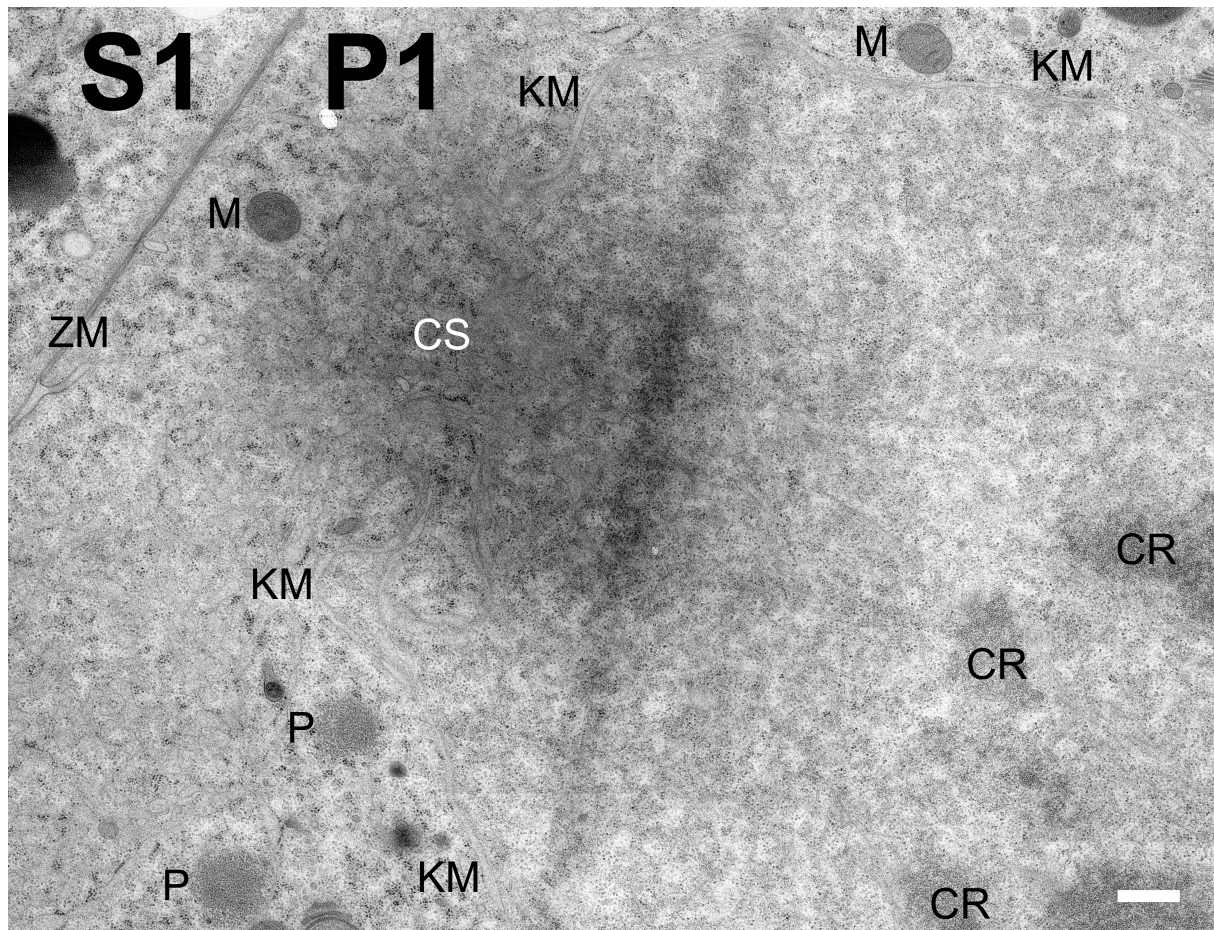


Abb. 30: EM-Schnitt durch P1-Anaphasenzelle von *R. culicivora*

Ein Centrosom (**CS**) der P1-Teilungsspindel liegt nah an der Zellmembran (**ZM**) in einem Fenster der intakten Kernmembran (**KM**), wodurch das Kernplasma vom organellreichen Zytoplasma separiert bleibt. Vom Centrosomen gehen Mikrotubuli zu den kondensierten Chromosomen (**CR**) aus. Im Zytoplasma können neben Mitochondrien (**M**) und viel ER nahe der Kernmembran (**KM**) auch nicht membranumgrenzte Strukturen (**P**) erkannt werden. **Eichstrich:** 0,5µm.

Die beobachteten nicht membranumgrenzten granulären Strukturen wurden in *R. culicivora* bisher nur in Keimbahnzellen gefunden wurden. Dieses offenbar keimbahnspezifische Vorkommen sowie ihre Form und Anordnung nahe der Kernmembran lassen den Schluss zu, dass es sich hierbei um P-Granula handelt. Jedoch lassen sich diese nicht wie bei *C. elegans* und nahen Verwandten mit spezifischen Antikörpern gegen *C. elegans* anfärben. Ihre asymmetrische Verteilung deutet jedoch eine für die Aufrechterhaltung des Keimbahnschicksals ähnlich wichtige Funktion wie in *C. elegans* an.

Die EM-Aufnahmen (Abb. 29a, b) zeigen eine asymmetrische Verteilung zytoplasmatischer Komponenten. So handelt es sich bei den weißen Granula vermutlich um das braune Pigment, welches jedoch vom Kontrastmittel nicht erfasst ist und weiß erscheint. Hierfür spricht auch die asymmetrische Verteilung der weißen Granula zum posterioren Pol der P0 und letztendlich nach S2, welche analog zur Segregation der braunen Farbkomponente erfolgt.

4.3.6 Frühe Musterbildung, Achsendetermination und Polaritätsumkehr

In *C. elegans* ist die frühe Musterbildung invariant, die Teilungsspindeln in S1 und P1 stehen senkrecht zueinander. Während der Teilung zum 4-Zell Embryo formt sich, aufgrund der begrenzenden Eischale, ein rhombusförmiges Stadium, in welchem die drei Körperachsen definiert sind (Abb. 31A-C, Sulston et al., 1983). In einem als Polaritätsumkehr der Keimbahn (Schierenberg, 1987) beschriebenen Prozess kommt mit der Teilung der P2 die Keimbahnzelle P3 anterior vor ihrer somatischen Schwester S3 zu liegen und ein essentieller Kontakt zwischen Darm (S2p) und Keimbahn (P3) wird hergestellt (Abb. 31E).

Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Frühentwicklung dieser beiden innerhalb des Taxons Nematoda phylogenetisch entfernten Spezies festzustellen, wurden Embryonen von *R. culicivorax* untersucht und *C. elegans* gegenübergestellt.

Die Messung des Zellumfanges zeigt, dass bei *R. culicivorax* im Gegensatz zu *C. elegans* aus der Teilung von P0 zwei Tochterzellen von annähernd gleichem Volumen hervorgehen ($n=5$; Abb. 31a). Beide teilen sich normalerweise gleichzeitig, selten leicht asynchron, mit gleicher Teilungsspindelorientierung wie P0 (Abb. 31a, b und 32C), während sich in *C. elegans* P1 kurz nach S1 teilt und die Teilungsspindeln in beiden Zellen im rechten Winkel zueinander stehen (Abb. 31A und 32C Einschub), wobei die Spindel in P1 erst nach einer Drehung um 90° in gleicher Orientierung wie die Teilungsspindel der P0 zu liegen kommt. In *R. culicivorax* teilen sich anders als bei *C. elegans* S1 und P1 asymmetrisch, dabei hat S1p etwa das 1,5-fache Volumen von S1a und S2 etwa das fünffache Volumen von P2 ($n=5$; Abb. 32e). Allerdings ist innerhalb der begrenzenden Eischale kein Platz für eine lineare Streckung der sich teilenden S1 und P1 (Abb. 31b und 32d, e). Aufgrund eines nietenartigen Verankerungspunktes zwischen diesen beiden Zellen (lila Kreis; Abb. 31a und 32b, d) können sie sich während der Teilung nicht gegeneinander verschieben, sondern nur kippen, so dass die entstehenden Zellen umgehend in ein rhombusförmiges 4-Zell Stadium übergehen. Weiterführende 4D Aufnahmen von *R. culicivorax* zeigen, dass sich weder S1p + P2 (Abb. 32e), S1pp + P2 (Abb. 32f und 35e, f), S1ppp + P3 (Abb. 37d) noch S1pppp + P4 (Abb. 37f) relativ gegenüber diesem nietenartigen Verankerungspunkt verschieben. Auch lässt sich beobachten, dass sich die Zellkerne im 2-Zell Stadium asymmetrisch, zueinander gerichtet an diesem Verankerungspunkt neu bilden (Abb. 32b, c). Sowohl *C. elegans* als auch *R. culicivorax* formen ein 4-Zell Rhombusstadium, in welchem die drei Körperachsen definiert sind (Abb. 31C+c). Jedoch unterscheidet sich die Art und Weise, wie es zur Festlegung der Körperachsen kommt, zwischen beiden Spezies dramatisch (Abb. 31a-c). Durch die Umlagerung zum Rhombus werden sowohl die anterior-posteriore als auch die dorso-ventrale Körperachse definiert (Abb. 31c und 32e). Zellstammbaumanalysen (Kapitel 4.3.10 + 4.3.4) zeigen dabei, dass S1p den ventralen Bereich und S2 den dorsalen Bereich entlang der dorso-ventralen Körperachse in *R. culicivorax* einnimmt, deren Polarität somit relativ zu *C. elegans* umgekehrt ist. Die

symmetrischen Teilungen der S1a und S2 auf dem Weg zum 7-Zell Stadium definieren in der Folge die rechts-links Körperachse (Abb. 31d und 24d). Anders als bei allen bisher beobachteten Nematoden findet in *R. culicivorax* eine Polaritätsumkehr bereits in der Keimbahnzelle P1 statt.

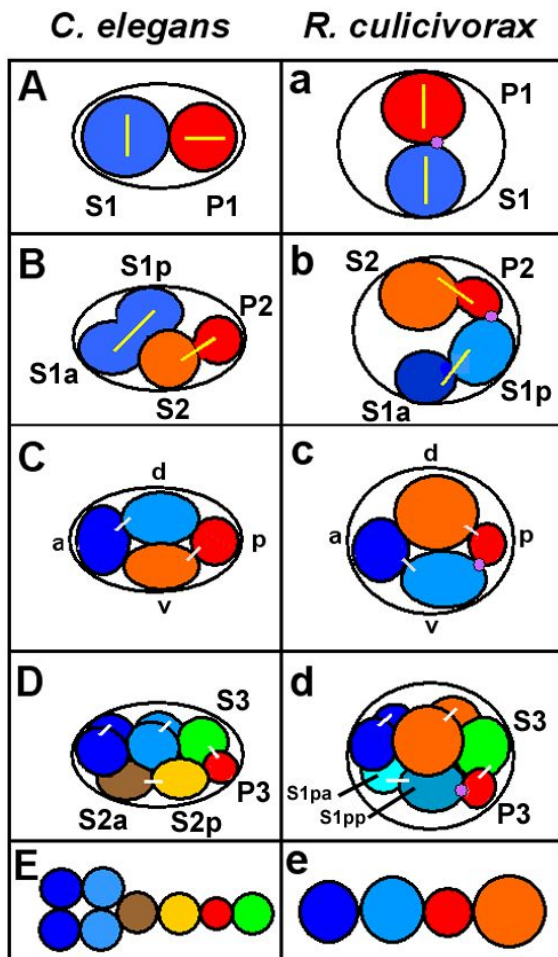


Abb. 31: Frühe Musterbildung und Achsendetermination bei *C. elegans* und *R. culicivorax*

(A-E) *C. elegans*, (a-e) *R. culicivorax*

a) Die Teilungsspindeln der gleichgroßen Geschwisterzellen liegen longitudinal ausgerichtet. b-c) Aufgrund der begrenzenden Eischale geht der sich linear teilende 4-Zell Embryo in ein Rhombusstadium über. c) Anders als bei *C. elegans* markiert S2 den dorsalen Pol, S1p den ventralen Pol des Embryos. d) S1a teilt sich symmetrisch mit transverser, S1p asymmetrisch mit anterior-posteriorer Orientierung. e) Formalisierte Darstellung des Embryos ohne Eischale; eine Polaritätsumkehr in der Keimbahn findet bereits in P1 und nicht wie bei *C. elegans* in P2 statt.

Dunkelbau: S1a, **hellblau:** S1p, **orange:** S2, **grün:** S3, **rot:** Keimbahn; **gelbe Linien:** Teilungsspindeln, **lila Kreis:** nietenartige Verbindungsstelle, der gegenüber keine Zellverschiebung stattfindet. **Orientierung:** A-D, a-d) linke Lateralansicht, E, e) Dorsalansicht.

Obwohl bei *R. culicivorax* der Darm von Nachkommen der Zelle S1 abstammt, kommt es aufgrund der Polaritätsumkehr in P1 zu einem Kontakt zwischen der Darmvorläuferzelle (S1pp) und der Keimbahn (P3), welcher in *C. elegans* für die Darminduktion essentiell ist (Goldstein, 1992; Schierenberg, 1987). Ob die bei *R. culicivorax* auftretende Polaritätsumkehr in P1 Ursache oder Wirkung der Darmschicksalsfestlegung in S1pp ist, bleibt ebenso wie eine potentielle Induktion zu klären. Besonders interessant ist das Auftreten eines nietenartigen Verankerungspunktes, welcher über mehrere Zellgenerationen erhalten bleibt und dessen Natur in Kapitel 4.3.7 näher untersucht wird.

4.3.7 Die RFM als Verankerungspunkt zwischen Zellen

Durch 4D-Analysen der frühen Musterbildung von *R. culicivora* wurde die Existenz eines Verankerungspunktes, der ein gegeneinander Verschieben von Zellen über mehrere Zellgenerationen verhindert, offensichtlich. DIC Aufnahmen zeigen, dass nach der Teilung von P0 sich die neu bildenden Zellkerne des 2-Zell Stadiums asymmetrisch zu diesem Verankerungspunkt hin ausrichten (Abb. 32b,c).

Um zu prüfen, ob es sich bei dem Verankerungspunkt um den Midbody (MB), als Relikt der Teilung von P0, handelt, wurden Antikörperfärbungen von frühen Embryonalstadien von *R. culicivora* gegen α -Tubulin angefertigt (Abb. 32).

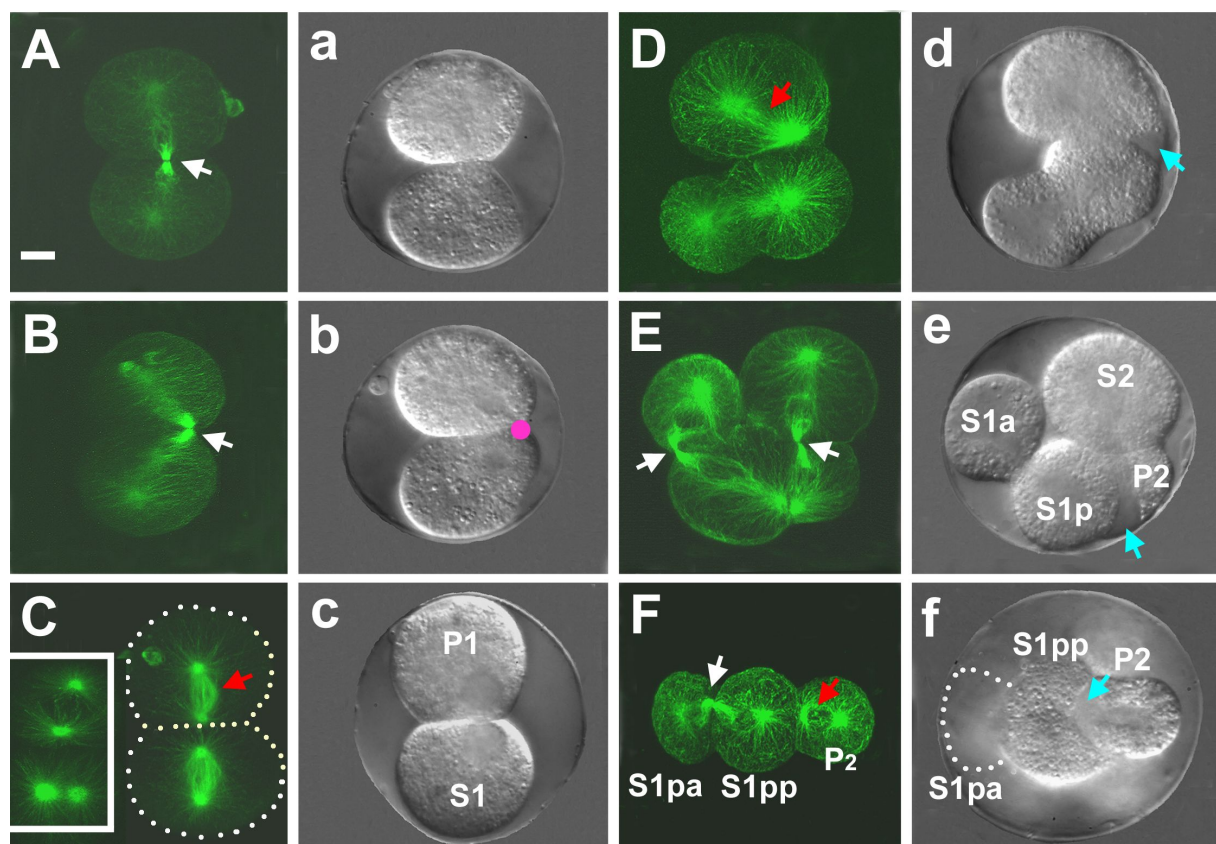


Abb. 32: Frühe Teilungen, Teilungsspindeln und Midbodies in *R. culicivora*

A) Frühes 2-Zell Stadium mit prominentem MB zwischen S1 und P1. **B)** Die rotierte Darstellung von A demonstriert die periphere Position des MB. **b-c)** Zellkerne beginnen sich asymmetrisch hin zur RFM zu formen. **C)** Teilungsspindeln beider Zellen entlang der anterior-posterioren Körperachse orientiert. Teilungsspindel in P1 asymmetrisch zu S1 verschoben. Der Einschub zeigt ein 2-Zell Stadium von *C. elegans*. **D)** Beide Zellen teilen sich synchron mit starker asymmetrischer Position der Teilungsspindel in P1. **d-f)** In der Keimbahn erscheinen dotterfreie Bereiche in der Region des RFM (hellblaue Pfeile). **E-F)** In den entstehenden 4-Zell und 7-Zell Stadien liegen prominente MB zwischen den Schwesterzellen. **F)** (optischer Schnitt) Teilungsspindel in P2 asymmetrisch zu S1pp verschoben. **weiße Pfeile:** Midbodies, **rote Pfeile:** Asymmetrisch verlagerte Teilungsspindel in der Keimbahn, **blaue Pfeile:** Dotterfreie Bereiche in der Keimbahn, **lila Kreis:** Nietenartiger Verankerungspunkt, RFM (Region of the first midbody). A-F) Computerrekonstruierte LSM-Aufnahmen α -Tubulin markierter Embryonen, a-f) zeitlich vergleichbare DIC Aufnahmen außer c, einer zeitlich früheren DIC Aufnahme. **Orientierung:** a-e) posterior oben, linke Lateralansicht. f) Ventralansicht. **Eichstrich:** 10µm.

Die Antikörperfärbungen gegen α -Tubulin zeigen zwischen S1 und P1 einen peripher liegenden prominenten MB an der Stelle des oben beschriebenen nietenartigen Verankerungspunktes (Abb. 32A, a, B, b). Die sich in S1 und P1 neu formierenden Zellkerne lagern sich asymmetrisch zu diesem MB hin (Abb. 32B, b, c). In der Entwicklung vom 2- zum 4-Zell Embryo (Abb. 32d, e) und vom 4- zum 7-Zell Embryo können membran nahe dotterfreie Bereiche an diesem Verankerungspunkt zwischen S1p und P2, bzw. S1pp und P2 ausgemacht werden. Die korrespondierenden α -Tubulin Markierungen können den aus der P0 Teilung resultierenden MB zwar nicht mehr nachweisen, zeigen statt diesem jedoch eine cortikale Verankerung der Teilungsspindel in den Keimbahnzellen P1 und P2 (Abb. 32D-F). Aus diesem Grund wird dieser Bereich im Folgenden als „Region of the first Midbody“ (RFM) bezeichnet.

Die Teilungsspindeln der angrenzenden Zellen S1p, S1pp, S1ppp, P1, P2, P3 und P4 orientieren sich mit Ausrichtung zur RFM (Abb. 32C, F und 37d-f) und darüber hinaus kann in den Keimbahnzellen P1-P3 eine asymmetrische Verschiebung der Teilungsspindel, hin zur RFM, beobachtet werden (Abb. 32C-D, F und 35e, f; P3 nicht gezeigt).

Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die RFM als Verankerungspunkt zwischen der Keimbahn (P1-P4) und der jeweiligen Darmvorläuferzelle (S1, S1p, S1pp und S1ppp) dient. Ein direkter Kontakt ist in *C. elegans* für die Darminduktion nötig (Goldstein, 1992; Schierenberg, 1987). Durch diese Verankerung entsteht eine Zellreihe, welche die Mittellinie des Embryos bildet und gleichzeitig die anterior-posteriore Körperachse definiert. Darüber hinaus bleibt zu testen, ob die RFM für die Orientierung und im Falle der Keimbahn auch für die asymmetrischen Verschiebungen der Teilungsspindeln verantwortlich ist oder ob Zell-Zell Interaktionen hierfür verantwortlich sind.

4.3.8 Laserbestrahlung der RFM führt zum Verlust von Asymmetrien

Um zu testen, ob das in den Kapiteln 4.3.2 und 4.3.7 beschriebene asymmetrische Zellverhalten während der frühen Furchungen von *R. culicivora* eine zellautonome Eigenschaft ist oder durch die benachbarte Zelle induziert wird, wurden Laserablationsexperimente durchgeführt.

Nach Ablation von S1 (n=24) und P1 (n=13) verhalten sich die überlebende Zelle und ihre Nachkommen in Bezug auf Abfolge, Orientierung und frühe Musterbildung bzw. der Farbstoffsegregation wie im unmanipulierten Embryo. Dieses Verhalten unterstützt die Vorstellung eines autonomen frühen Zellverhaltens.

Im Gegensatz dazu wird nach Ablation der RFM im 2-Zell Stadium ($n=7$) eine dramatische Veränderung des Zellverhaltens von S1 und P1 und deren Nachkommen beobachtet (Abb. 33). Die im 2-Zell Stadium randständig zur RFM gerichteten asymmetrischen Positionen der Zellkerne gehen verloren und sie nehmen eine zentrale Position ein (Abb. 33A). Die Spindelorientierung in S1 und P1 variiert von normaler anterior-posteriorer Ausrichtung ($n=2$; Abb. 33B) über Zwischenformen ($n=2$) bis zur komplett transversen ($n=3$; Abb. 33b) Ausrichtung. Alle beschriebenen Varianten zeigen keine asymmetrischen Zellteilungen in Bezug auf das Zellvolumen (Abb. 33D, d). Eine Farbstoffsegregation findet nur in Embryonen mit anterior-posteriorer Ausrichtung der Teilungsspindel statt (Abb. 33D) und der Farbstoff wird in weiteren Teilungen gleichmäßig weitergegeben. Kontrollexperimente mit vergleichbaren Strahlungsdosen auf Zytoplasma ($n=7$) oder Zellmembran abseits der RFM ($n=7$), verlangsamten (wie auch bei der S1 und P1 Ablation) minimal die Zellzyklen, beeinflussen jedoch weder asymmetrische Zellteilungen noch Musterbildung oder Farbsegregation.

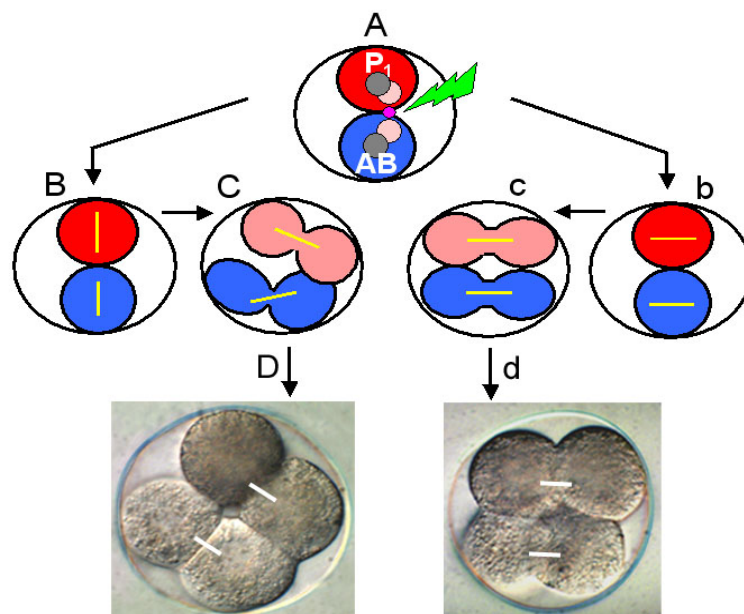


Abb. 33: Symmetrische Zellteilungen nach Laserablation der RFM

A) Nach Laserablation der RFM nehmen die Kerne (rosa) mittige Positionen (grau) in der Zelle ein. Zwei Varianten (**B-D**; **b-d**) der anschließenden Zellteilungen und Musterbildung sind gezeigt. **B)** Longitudinal orientierte, jedoch nicht asymmetrisch positionierte Spindel. **C)** Daraus resultieren symmetrische Zellteilungen mit einem normalen Rearrangement zum Rhombusstadium. **D)** Das braune Zytoplasma wird ungleich zwischen den P1 Töchtern verteilt. **b)** Senkrecht orientierte Spindelausrichtung (im Vergleich zu B) ohne asymmetrische Verschiebung. **c)** Daraus resultieren symmetrische Zellteilungen mit einem abnormalen Rearrangement der Zellen. **d)** Das braune Zytoplasma wird gleichmäßig zwischen den Töchtern der P1 verteilt. **Gelbe Linien:** Teilungsspindeln, **weiße Linien:** Geschwisterzellen, **lila Kreis:** Nietenartiger Verankerungspunkt, RFM (Region of the first midbody). **Orientierung:** posterior oben.

Diese Beobachtungen lassen die Schlussfolgerungen zu, dass die RFM einen Einfluss auf die korrekte anterior-posteriore Orientierung der Teilungsspindel und deren asymmetrische, intrazelluläre Positionierung sowie die daraus resultierenden asymmetrischen Teilungen hat. Diese Experimente unterstützen die Überlegungen aus den Kapiteln 4.3.2 und 4.3.3, dass eine asymmetrische Verteilung der Farbkomponente nur bei anterior-posterior ausgerichteten Teilungen erfolgen kann.

4.3.9 In polarisierten Zellen bilden sich Kappen von Interphasemikrotubuli

Eine Segregation der braunen Farbkomponente in manipulierten und unmanipulierten Embryonen von *R. culicivora* zeigt sich nur bei Teilungen entlang der anterior-posterioren Achse. Dies wirft die Frage nach den dafür verantwortlichen Mechanismen auf.

Die Untersuchungen von Teilungsspindeln und RFM mit Antikörpermarkierungen gegen α -Tubulin offenbarten überraschenderweise bisher unbeschriebene kappenförmig organisierte Mikrotubulistrukturen, die nur in der Interphase von P0 ($n > 20$, Abb. 34a'), S1 und P1 ($n > 20$, Abb. 34b'), P2 ($n = 6$), S1a ($n = 8$) und S1p ($n > 20$, Abb. 34c') sowie S1pp ($n = 7$, Abb. 34d') beobachtet werden. In der LSM Computerrekonstruktion wird diese Mikrotubulikappe in der Aufsicht als große runde Zellkortexstruktur dargestellt, von der die Mikrotubuli strahlenförmig organisiert ausgehen (Abb. 35d).

Die Lage aller beobachteten Mikrotubulikappen ist polar. So liegen die Mikrotubulikappen in P0, am anterioren Zellkortex, genau dem Polkörper mit seinem meiotischen Midbody gegenüber (Abb. 34a' und 35a, b). Die in S1 und P1 (Abb. 34b' und 35c), S1p und P2 (Abb. 34c') sowie S1pp (Abb. 34d' und 35e, f) beobachteten Mikrotubulikappen liegen genau gegenüber der RFM (magentafarbene Pfeilspitze). Die in S1a (Abb. 34c') beobachteten Mikrotubulikappen liegen genau gegenüber dem aus der S1 Teilung resultierenden Midbody. Mit dem Ende der Interphase werden die Mikrotubulikappen schwächer, während sich Mikrotubuli um das Centrosom anlagern (Abb. 35c), um dann in der Mitosephase vollständig zu verschwinden (Abb. 32C-D, F).

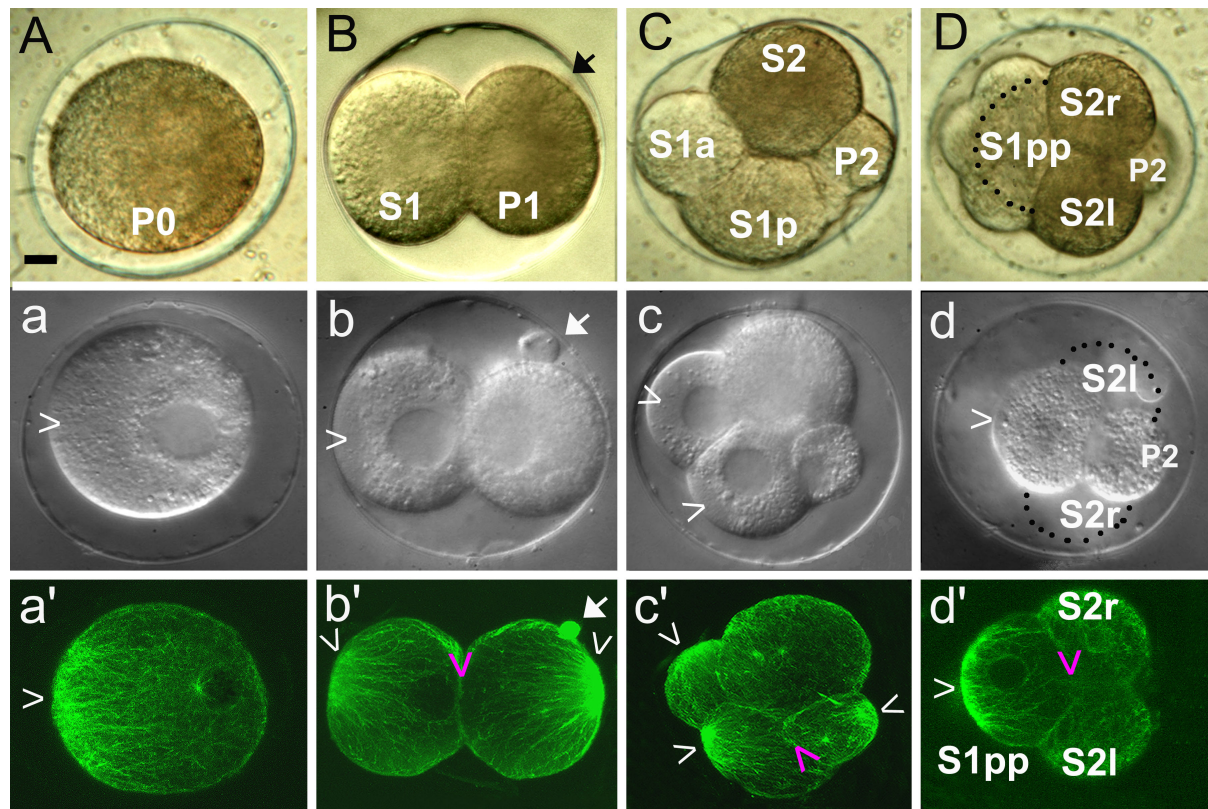


Abb. 34: Granulafreie Kappen und Mikrotubulikappen in *R. culicivox*

Zeitlich übereinstimmende Aufnahmen mit A-D) Hellfeld- a-d) DIC- und a'-d') LSM Computerrekonstruktionen α -Tubulin markierter Embryonen. **A-D)** Farbe erst asymmetrisch in P0, dann Segregation über P1 und S2 gleichmäßig in alle S2 Nachkommen. **a-d)** Dotterfreie Kappen treten immer in der Interphase in P0, S1, S1a, S1p und S1pp auf. **a'-d')** α -Tubulin Antikörpermarkierungen stellen Mikrotubulikappen in den Interphasezellen P0, P1, P2, S1, S1a, S1p und S1pp dar. **Pfeil:** Polkörper; **weiße Pfeilspitze:** dotterfreie Kappen und Mikrotubulikappen; **magentafarbene Pfeilspitze:** RFM. **Orientierung:** anterior links A-C) linke Lateralansicht, D) Dorsalansicht, d+d') Ventralansicht. **Eichstrich:** 10 μ m.

Die Beobachtung der Frühentwicklung ($n > 50$) von *R. culicivox* mit DIC offenbart zusätzlich zu asymmetrischen Teilungen auch eine asymmetrische Granulaverteilung zwischen den Tochterzellen von S1 (Abb. 34C, c), wobei S1a in seltenen Fällen sogar fast dotterfrei vorliegt (Abb. 29b). Darüber hinaus lässt sich die Entstehung immer gleich ausgerichteter und angeordneter dotterfreier kappenförmiger Bereiche beobachten ($n > 50$), die sich immer in der Interphase von P0 (Abb. 34a), S1 (Abb. 34b) sowie S1p (Abb. 34c) ausbilden. Weniger deutlich tritt eine solche Kappenbildung in den Interphasen von S1a ($n > 30$, Abb. 34c), S1pp ($n > 20$, Abb. 34d) und in extrem kleiner Ausprägung in P1 ($n = 7$, Abb. 34c) auf. Dabei kann generell bei allen dotterfreien Bereichen beobachtet werden, wie ausgehend von einem kleinen Bereich des Zellkortex sich Granula gerichtet verlagern. Dies sieht weniger nach einer den gesamten Embryo betreffenden Strömung als vielmehr nach einem regional begrenzten Prozess aus, der zu einer dotterfreien oder zumindest dotterarmen P0 Kappe führt.

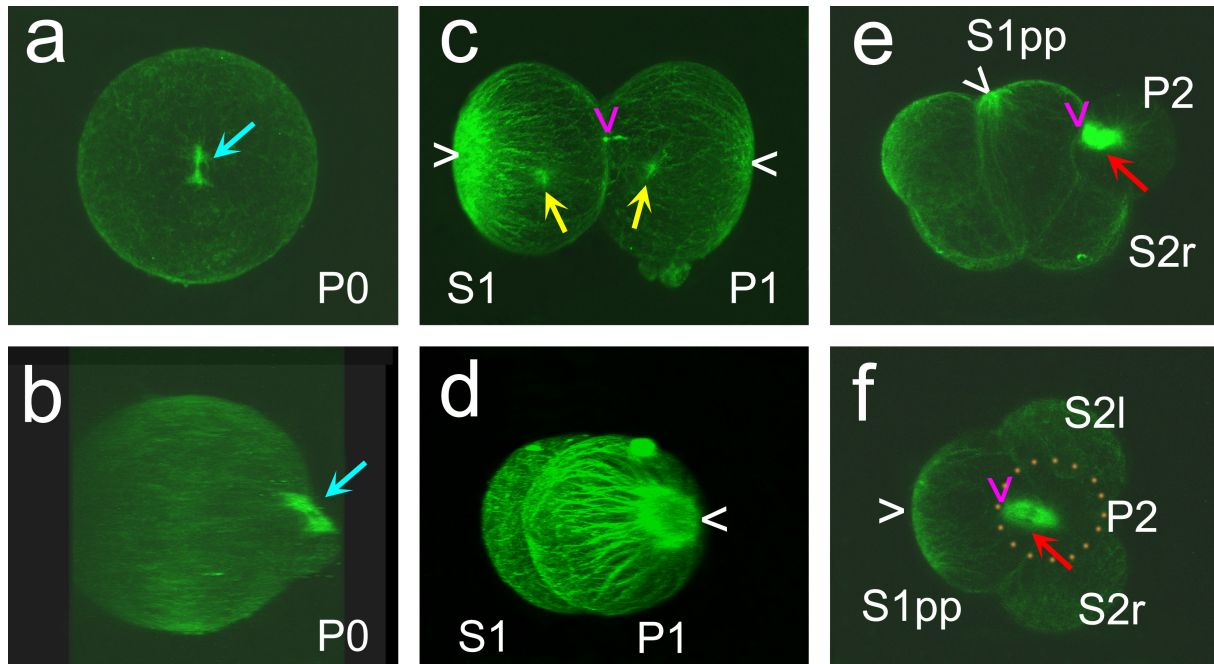


Abb. 35: Midbodies, Mikrotubulikappen und Polarität in *R. culicivorax*

LSM Aufnahmen von α -Tubulin Antikörpermarkierungen. **a+b)** Posteriore und um 90° gedrehte laterale Ansicht des Midbody (blauer Pfeil) zwischen P0 und dem Polkörper. **c)** Laterale Ansicht auf Mikrotubulikappen (weiße Pfeilspitzen) des 2-Zell Stadiums gegen Ende der Interphase, Midbody (RFM; magentafarbene Pfeilspitze) der P0 Teilung, Polkörper und sich um Centrosomen (gelbe Pfeile) ausbildende Mikrotubuli in S1 und P1 sind sichtbar. **d)** Posteriore Ansicht auf P1 Mikrotubulikappe zeigt eine ringförmige Region, von der die Mikrotubulifasern ausgehen. **e+f)** Laterale und um 90° gedrehte ventrale Ansicht des 7-Zell Stadiums zeigten die Mikrotubulikappe in S1pp gegenüber der RFM und die Teilungsspindel in P2 asymmetrisch (roter Pfeil) zur RFM hin verschoben.

Die beobachteten in der Interphase auftretenden dotterfreien Kappen (Abb. 34a-d) korrespondieren zeitlich und räumlich mit den beobachteten Mikrotubulikappen. Einzige Ausnahme stellt die Mikrotubulikappe der P2 dar, wo keine dotterfreie Kappe beobachtet werden konnte.

Sind die beobachteten Mikrotubulikappen verantwortlich für die oben beschriebenen asymmetrischen Dotter- und Farbverteilungen in manipulierten und unmanipulierten Embryonen von *R. culicivorax*?

Für die Teilungen der Zellen P0, S1, und S1p in kann eine direkte Korrelation zwischen beobachteter Dotter- und Farbverteilung und der Ausrichtung der Mikrotubulikappen hergestellt werden. In S1a kann eine asymmetrische Verteilung von der Kappe weg beobachtet werden (Abb. 34c, c' und 29b), durch deren transverse Teilung wird der Dotter jedoch gleichmäßig unter den Tochterzellen verteilt. In P2 kann trotz auftretender Mikrotubulikappe keine weitere sichtbare asymmetrische Verteilung zytoplasmatischer Komponenten beobachtet werden. Die Verteilung der Farbkomponente zwischen den Tochterzellen von P1 (Abb. 34B, C) findet in Richtung der Mikrotubulikappe statt.

Die hier dargestellten Beobachtungen lassen die Schlussfolgerungen zu, dass es sich bei der ringförmigen Zellkortexstruktur (Abb. 35d), von der aus die Mikrotubuli strahlenförmig ausgehen, um ein bisher unidentifiziertes „Mikrotubuli organisierendes Zentrum“ (MTOC) handeln könnte. Dabei steht die polare Lage dieses MTOC in P1, P2, S1 und S1p in räumlicher Beziehung zur RFM. Die gleichzeitige Antikörpermarkierung von Mikrotubulikapen und Centrosomen zeigt, dass es sich um zwei unterschiedliche MTOCs handeln muss.

4.3.10 In *R. culicivora* tragen Gründerzellen weitgehend monoklonal zu Organen bei

C. elegans besitzt einen invarianten Zellstammbaum mit somatischer Zellkonstanz bei variabler Keimzellzahl und das L1 Juvenilstadium hat beim Schlüpfen 558 somatische Zellkerne. Er ist der erste Organismus, dessen embryonaler- (Sulston et al., 1983) und postembryonaler- (Kimble und Hirsh, 1979; Sulston und Horvitz, 1977) Zellstammbaum vollständig analysiert wurde. Daneben gibt es innerhalb der Chromadorea noch weitere ausführliche Arbeiten über die Zellstammbäume von *P. marina* (Houthoofd et al., 2003), *C. briggsae* (Zhao et al., 2008) oder *A. megalocephala* (Müller, 1903). Wenige Arbeiten beschäftigen sich hingegen mit den Enoplea (Malakhov, 1994; Voronov, 1999; Voronov und Panchin, 1998) und ausführliche Zellstammbaumanalysen eines Vertreters der Enoplea wurden bisher nicht durchgeführt.

Um zu prüfen, wie in *R. culicivora* die Zellschicksale innerhalb des Zellstammbaumes und somit der somatischen Gründerzellen verteilt sind und ob es sich wie bei *C. elegans* um einen polyklonal aufgebauten invarianten Zellstammbaum mit somatischer Zellkonstanz handelt, wurde er mittels 4D-Mikroskopie untersucht.

R. culicivora ist deutlich transparenter als seine nahen Verwandten (Clade 2), jedoch nicht so transparent wie *C. elegans*, was die Untersuchung embryonaler Stadien höherer Zellzahl erschwert. Die in diesem Abschnitt zusammengefassten embryonalen Daten über *R. culicivora* setzen sich aus der 4D-Analyse von Embryonen in dorsaler (n=3) und ventraler (n=3) Lage zusammen. Dabei entwickelten sich alle ausgewerteten Embryonen bei 23°C zu normalen Jungtieren. Die Zellstammbaumanalyse wurde bis zum beginnenden Morphogenesestadium durchgeführt, in welchem eine Drehung des Embryos aus der Dorsal- bzw. Ventralansicht in die Lateralansicht stattfindet.

Ähnlich wie für *C. elegans* beschrieben (Schnabel et al., 1997), sind die Zellzykluslängen und Teilungsabfolgen in *R. culicivora* zwischen einzelnen Individuen leicht unterschiedlich. Die Zellzykluslängen sind für einzelne somatische Gründerzellen charakteristisch und eine Abstufung von S1 (schnelle Zyklen) zu S4 (langsame Zyklen) ist erkennbar (Abb. 36b). Die Zellzykluslänge der Keimbahnzellen ist langsamer als die ihrer somatischen Schwestern und die durchschnittlichen Zellzykluslängen nehmen bei allen mit jeder Teilungsrunde zu. Interessant ist eine Aufspaltung in Stammbaumzweige mit unterschiedlichen Zellzykluslängen innerhalb der S1p (Abb. 36b und 37m), welche sich allesamt von S1a

unterscheiden. In *C. elegans* weisen deutlich unterschiedliche Zellzykluslängen auf unterschiedliche Zellschicksale hin (Sulston et al., 1983).

Die durchschnittliche Zellzahl ($n=5$) frisch geschlüpfter, fixierter und mit DAPI gefärbter L2 Juvenilstadien wurde auf ca. 790 bestimmt. Dabei ist zu beachten, dass *R. culicivorax* seine erste Häutung bereits innerhalb der Eischale vollzieht und als L2 schlüpft.

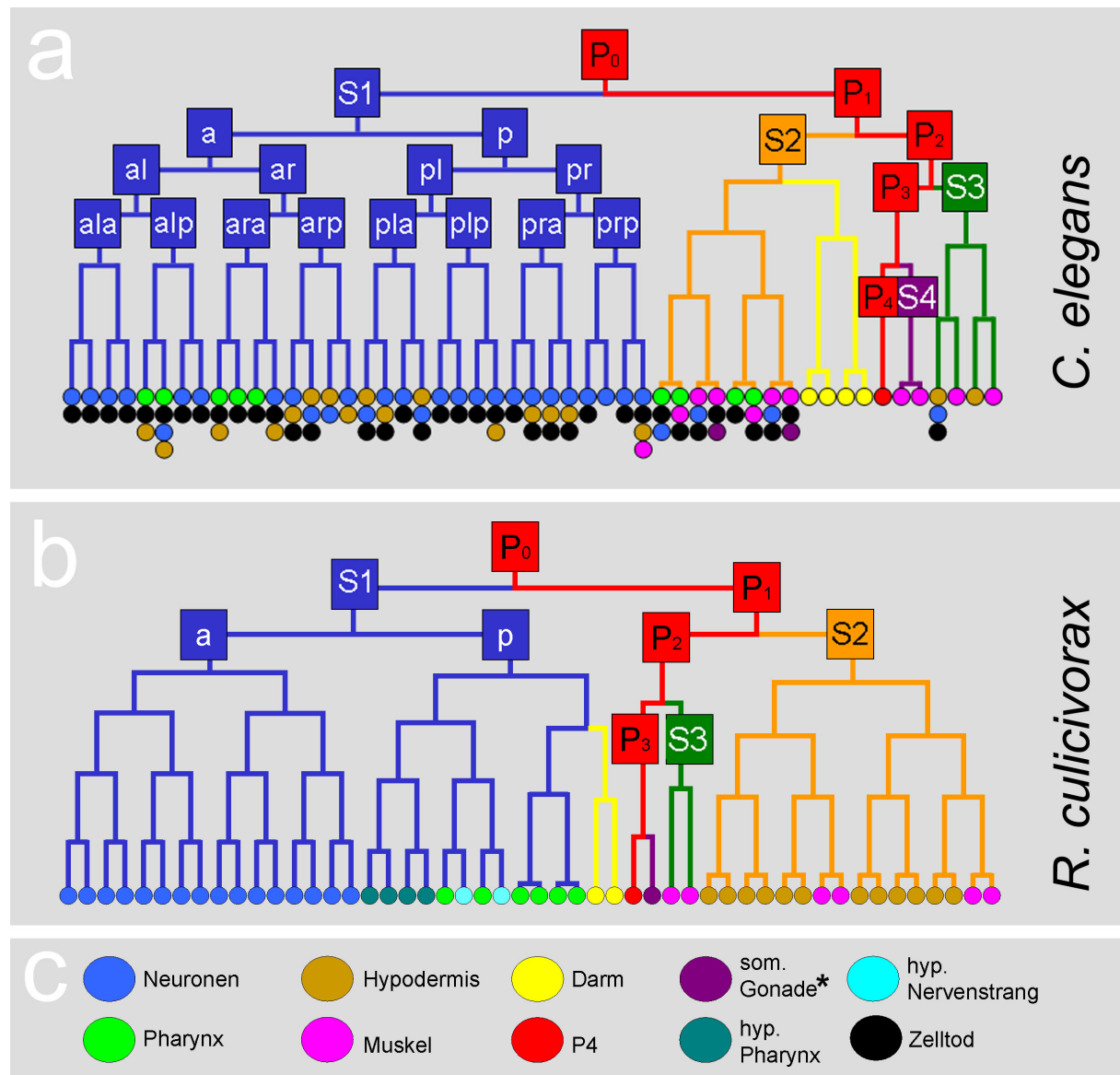


Abb. 36: Zellstammbaum von *R. culicivorax* versus *C. elegans*

Zellstammbaum von (a) *C. elegans* (modifiziert nach Sulston et al., 1983) und (b) *R. culicivorax*, beide in S-Nomenklatur (Boveri, 1899; 1910). Die Tochterzellen einer Gründerzelle werden gemäß ihrer Lage nach der Teilung benannt (Deppe et al., 1978; Sulston et al., 1983). Tochterzellen mit anteriorer, dorsaler und linker Position, relativ zu ihrer Geschwisterzelle, werden einem linken Zweig, Zellen mit posteriorer, ventraler und rechter Position einem rechten Zweig des Stammbaums zugeordnet. Die endständigen Kugeln stellen die in absteigender Häufigkeit aus 4D Analyse und Zentrifugationsexperimenten analysierten Schicksale (c) der aus weiteren Teilungen resultierenden Tochterzellen farblich dar. Hypothetische Zuordnungen sind markiert (hyp), oder beziehen sich nur auf *R. culicivorax* (*).

Das Auftreten von programmiertem Zelltod wurde aufgrund der mangelnden Transparenz nur in den Nachkommen von S1a und S1pa überprüft. Ihr Auftreten nach der Drehung des Embryos in die Lateralansicht, bzw. dem Einsetzen der Muskelkontraktion, macht die Zuordnung zu spezifischen Zellen des Zellstammbaumes ebenso unmöglich wie eine Zuordnung spezialisierter Zellschicksale innerhalb der Neuronen oder Pharynxzellen. Einige Zellen oder deren Teilungen konnten wegen ihrer lateralen Lage im Embryo und der dorsalen bzw. ventralen Aufnahmeperspektiven nicht weiter verfolgt werden. Insgesamt konnte in der Embryonalentwicklung die Entstehung von 664 Zellen verfolgt werden. Deren Schicksal durch 4D-Zellstammbaumanalysen und Markierung einzelner Zellstammbaumteile mittels gezielter experimenteller Fehlverteilung der braunen Farbkomponente größtenteils zugeordnet (Abb. 36b) und tabellarisch zusammengefasst werden (Tabelle 5). Dabei erlauben die beobachteten spezifischen Zellzykluslängen innerhalb der einzelnen Gründerzellen und die Tatsache, dass Zelltode erst später auftreten, die fehlenden Zellen durch Interpolation den definitiv beobachteten Zellen gegenüberzustellen.

Zellstammbaum			
Zellname	beobachtete Zellen	geschätzte Zellen *	Schicksal / gezählte Zellen
S1a	236	256	Neuronen
S1paa	42	64	<i>Pharynx</i>
S1pap	64	64	Pharynx <i>Nervenstrang</i>
S1ppa	64	64	Pharynx
S1ppp	16	(16)	Darm
S2xpp	32	(64)	Körpermuskeln
S2 Rest	174	192	Hypodermis
S3	32	(32)	Körpermuskeln
S4	2	2	<i>somatische Gonade</i>
P4	2	2	Keimbahn
Summe	664	756+	~790

Tabelle 5: Zellstammbaumanalysen und Schicksalsanalysen in *R. culicivox*

Gegenüberstellung der beobachteten Nachkommen einzelner Gründerzellen und der geschätzten (*) Nachkommen. Die Schätzung basiert auf Zellzykluslängen, synchrones Teilungsverhalten von Zellen eines Zellstammbaumastes, der bilateralen Symmetrie des Embryos und dem erst späten Auftreten von programmiertem Zelltod. Bei den in Klammern angegebenen Werten kann eine weitere Zellteilungsrunde nicht ausgeschlossen werden, war aufgrund der Transparenz aber nicht sicher zu bestimmen. Die mittels 4D-Mikroskopie und experimenteller Fehlverteilung des braunen Zytoplasmas analysierten Zellschicksale sind fettgedruckt und graphisch in Abb. 36b zu dargestellt, hypothetische Zellschicksale sind *kursiv* gedruckt. Zellen wurden im L2 Juveninstadium gezählt (siehe 4.3.10).

Bei *C. elegans* werden die Organe, bis auf den Darm, gemeinsam von unterschiedlichen Gründerzellen gebildet. Darüber hinaus liefern die meisten Zellstammbaumzweige der Gründerzellen polyklonal Beiträge zu verschiedenen Geweben. So trägt von den dargestellten Zellstammbaumzweigen der S1 (ala, alp, ara, arp, pla, plp, pra und prp) lediglich ala monoklonal zu neuronalem Gewebe bei. Von den Zellstammbaumzweigen der restlichen Gründerzellen trägt lediglich S2p monoklonal zum Darm und S4 monoklonal zum Körpermuskel bei (Abb. 36a).

Bei *R. culicivorax* hingegen werden die Organe, bis auf den Körpermuskel, jeweils von einer einzelnen Gründerzelle gebildet. Zwar konnte der terminale Phänotyp der Nachkommen von S1a nicht in allen Fällen bestimmt werden, scheint jedoch monoklonal zu neuronalem Gewebe beizutragen. Hierfür spricht die uniforme Zellzykluslänge innerhalb der S1a Nachkommen, ihre bilateralsymmetrische Anordnung und die Tatsache, dass Hypodermis, Körpermuskel, Pharynx und Darm von anderen Gründerzellen gebildet werden. Darüber hinaus liefern die meisten Zellstammbaumzweige der Gründerzellen offenbar monoklonal Beiträge zu einem einzelnen Gewebe, so scheint lediglich S1pap polyklonal Beiträge zu verschiedenen Geweben zu liefern (Abb. 36b).

Diese Beobachtungen lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

Die somatischen Gründerzellen, welche entlang der Mittellinie entstehen und diese definieren, scheinen einen invarianten Zellstammbaum mit somatischer Zellkonstanz zu besitzen und bilden eine oder mehrere Zellgruppen mit distinkten Zellzykluslängen. Diese Zellgruppen tragen jedoch anders als bei allen bisher untersuchten Nematoden fast ausschließlich monoklonal zur Organogenese bei.

4.3.11 *R. culicivorax* besitzt keine Regulationsfähigkeit

Laserablationsversuche an *A. nanus* zeigten eine für Nematoden bis dahin unbekannte Fähigkeit zur Regulation, in dem Sinne, dass sich Gründerzellen nach einem hierarchischen Muster ersetzen können (Wiegner und Schierenberg, 1998; 1999).

Um zu testen, ob *R. culicivorax* ähnlich wie *A. nanus* Zellen nach einem hierarchischen Muster ersetzen kann oder eine generelle Fähigkeit zur Regulation besitzt, wurden Laserablationsexperimente durchgeführt.

Nach Laserablation der Zellen P1, P2, S1, S1a, S1p, S2 oder S3 (jeweils $n > 12$) teilen sich die verbleibenden Zellen mit leicht verlangsamten Zellzyklen weiter, allerdings entsteht in keinem Fall ein normaler Embryo, sondern nur ein Zellhaufen mit gewebespezifischer Differenzierung, jedoch ohne Morphogenese („Monster“). Lediglich nach Ablation der Zelle S4 ($n=7$) entwickeln sich über 50% ($n=4$) der Individuen zu sich bewegenden, schlupffähigen Würmern innerhalb der Eischale.

Diese Beobachtungen lassen die Schlussfolgerungen zu, dass *R. culicivorax* im Gegensatz zu *A. nanus* nicht in der Lage ist, verlorene Zellen zu ersetzen. Die Nachkommen der S4 sind für eine normale Embryonalentwicklung von *R. culicivorax* ebenso wie bei *C. elegans* nicht essentiell. Bei letzterem entstehen aus S4 20 Körpermuskelzellen, deren Verlust aber physiologisch kompensiert werden kann (Junkersdorf und Schierenberg, 1992). Bei *R. culicivorax* wurde hingegen nur eine einzige Teilung von S4 beobachtet und aus den beiden daraus resultierenden Zellen geht möglicherweise im weiteren Verlauf der Entwicklung die somatische Gonade hervor (Abb. 38a'-d' und Diskussion).

4.3.12 Gastrulation und Organogenese von Verdauungstrakt und Körpermuskulatur

Bei den Chromadorea stammt der Darm von S2 ab, wobei sich die Gastrulation der Rhabditia durch eine Einwanderung von zwei, der Chromadoria durch die Einwanderung einer einzelnen Darmvorläuferzelle auszeichnet (Malakhov, 1994; Schierenberg, 2006; Schierenberg und Lahl, 2004). In Kapitel 4.1 konnte die Gastrulation der Rhabditia mit und ohne Beteiligung eines Blastocoels, sowie unter Beteiligung eines ovalen oder schlitzförmigen Blastoporus gezeigt werden. Für die Enoplea ist bisher die Gastrulation ohne Blastocoel mit schlitzförmigem Blastoporus beschrieben worden (Malakhov, 1994). Bisher ist nur bei *T. diversipapillatus* die Beteiligung eines prominenten Blastocoels gezeigt worden (Schierenberg, 2005).

Um das Verhalten von einzelnen Zellen und Zellverbänden während der Gastrulation und Organogenese zu untersuchen, wurden 4D-Aufnahmen von *R. culicivorax* (Abb. 37) analysiert und 3D-Kugelmodelle (Abb. 38) mit Positions- und Schicksalsinformationen aus den Zellstammbäumen (Abb. 36) erstellt.

In einer Reihe stammzellartiger asymmetrischer Teilungen entstehen entlang der anterior-posterioren Körperachse die Gründerzellen S1-S4 und P4. Interessanterweise teilen sich S1p, S1pp, S1ppp, S4 und P4 ebenfalls in dieser Orientierung und bilden die an der Oberfläche einer kompakten Morula liegende Mittellinie des Embryos. Die Gastrulation von *R. culicivorax* beginnt mit der Einwanderung der Darmvorläuferzelle S1ppp, ohne vorherige Formation einer Blastula, eines Blastocoels oder kleiner flüssigkeitsgefüllter Hohlräume zwischen einzelnen Zellen (Abb. 37d, e). Die Darmvorläuferzelle stammt anders als bei den oben beschriebenen Chromadorea nicht von S2, sondern von S1 ab. Die Keimbahnzelle P4 folgt der Darmzelle assoziiert ins Innere, aber erst nach ihrer Einwanderung teilen sich beide entlang der Mittellinie (Abb. 37f, n und 38a-c). Als Folge ihrer Einwanderung entsteht ein ovaler Blastoporus genau auf der Mittellinie (Abb. 37h und 38A).

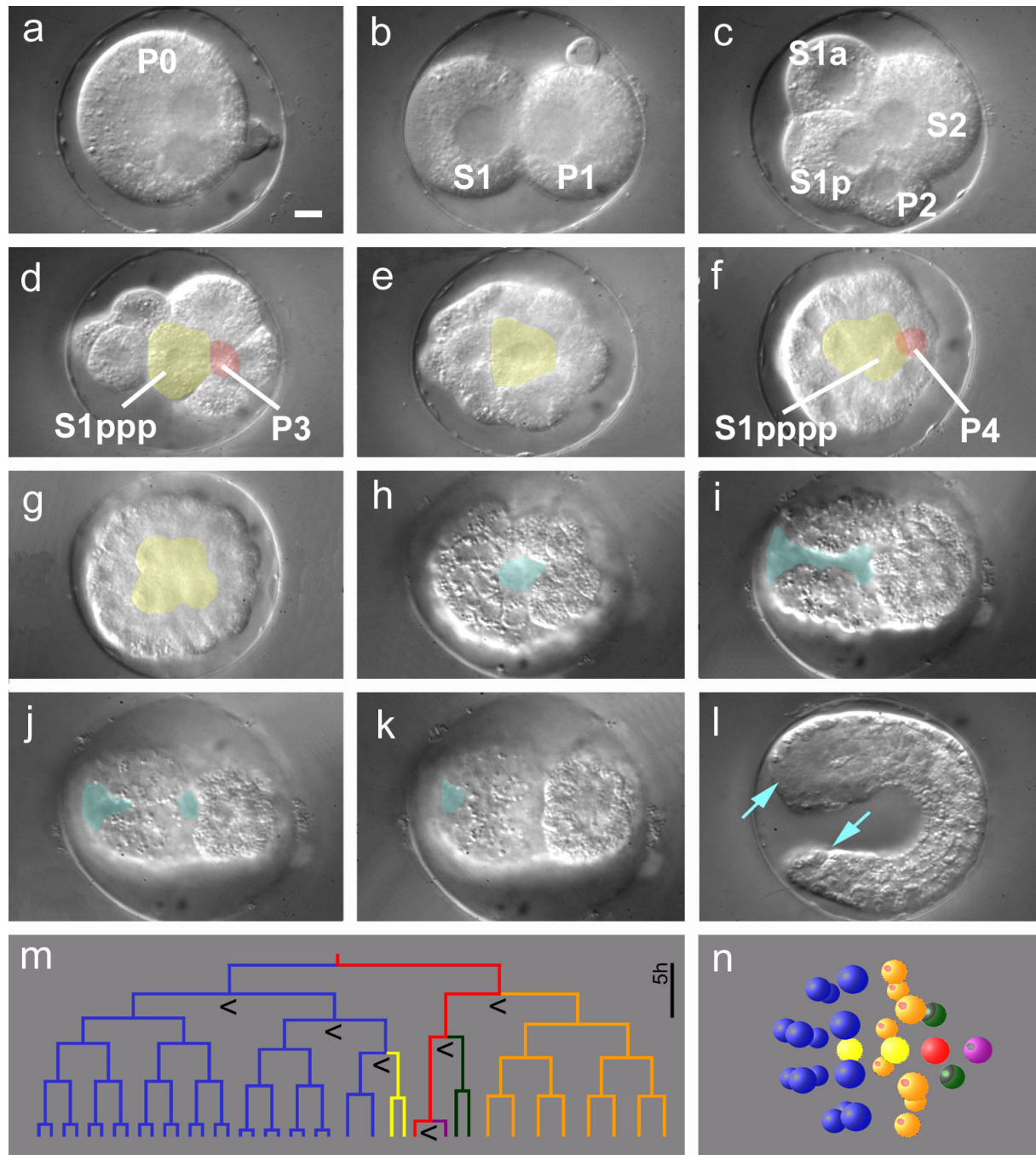


Abb. 37: Die Embryogenese von *R. culicivorax*

a-c) 1-Zell bis 4-Zell Stadium. **d)** Die Darmvorläuferzelle S1ppp (E) markiert den ventralen Pol. **e-g, n)** Gastrulationsbeginn, S1ppp (gelb) wandert ein und teilt sich. P4 folgt, teilt sich später entlang der anterior-posterioren Körperachse. Es ist kein Blastocoel vorhanden. **h-k)** Durch Zelleinwanderungen streckt sich der Blastoporus schlitzförmig entlang der anterior-posterioren Körperachse über 2/3 des Embryos, beginnt ausgehend von seiner Mitte sich reißverschlussartig zu beiden Polen zu schließen und nur eine punktförmige Öffnung am anterioren Pol bleibt erhalten **l)** und wird zur Mundöffnung, wohingegen der Anus als sekundärer Durchbruch neu entsteht (blaue Pfeile). **m)** Früher Zellstammbaum, in einer Reihe von stammzellähnlichen asymmetrischen (<>) Zellteilungen entstehen die Gründerzellen S1-S4, P4, Polaritätsumkehr tritt in P1 auf. **n)** 3D Kugelmodell des in f) dargestellten Embryos zeigt perfekte bilaterale Symmetrie, die Gründerzellen definieren die anterior-posteriore Körperachse und Mittellinie und die Nachkommen von S1a und S2 definieren die links-rechts Körperachse. **Farbkodierung:** s. Abb. 6. **Orientierung:** anterior links, a-c, l) linke Lateralansicht, d-k) Ventralansicht. **Eichstrich:** 10µm.

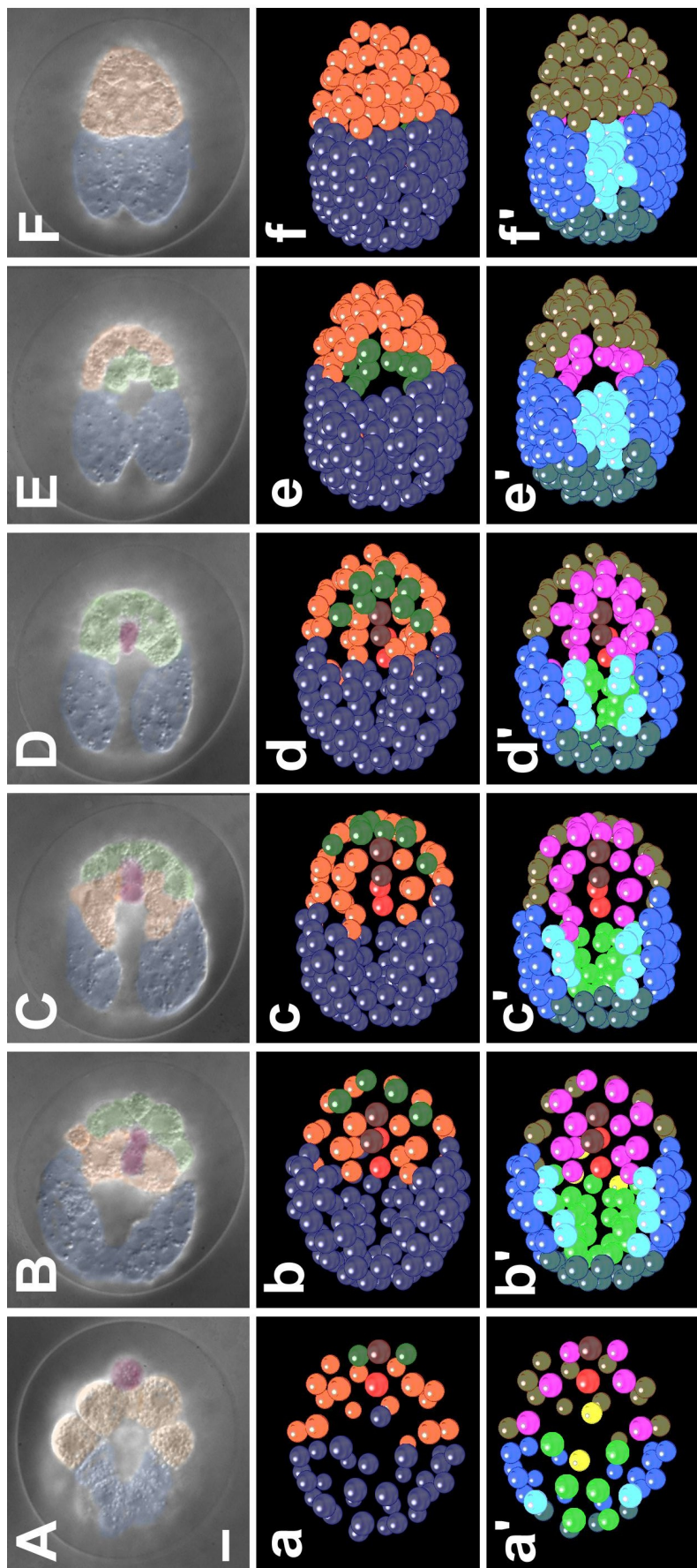


Abb. 38: Blastoporus- und Pharynxformation in *R. culicivora*

A-F) Durch Zelleinwanderungen entlang der anterior-posterioren Körperachse streckt sich der Blastoporus schlitzförmig über 2/3 des Embryos, wobei die S4 etwa den posterioren Punkt der Blastoporuspalte bildet. Zellen der linken und rechten Körperhälfte schieben sich über die Blastoporuspalte und überdecken diese. Von hier ausgehend zieht sich diese Überdachung reißverschlussartig zu beiden Polen der Spalte. **a-f)** Korrespondierende 3D-Kugelmodelle der in A-F) abgebildeten DIC-Aufnahmen; Modell eingefärbt nach Zellstammbaumzugehörigkeit: **blau** (S1), **orange** (S2), **dunkelgrün** (S3), **violett** (S4), **rot** (P4). **a'-f')** Korrespondierende 3D-Kugelmodelle der in A-F) abgebildeten DIC-Aufnahmen; Modell eingefärbt nach Zellschicksalen (Abb. 36). **Orientierung:** anterior links, Ventralansicht. **Eichstrich:** 10µm.

Die Nachkommen von S1paa, S1pap und S1ppa beginnen sich jeweils bilateralsymmetrisch links und rechts der Mittellinie anzuordnen, sich in anteriorer Richtung vom Blastoporus ausgehend, in einem Prozess, der an Neurulation erinnert, einzufalten und eine Blastoporusspalte zu bilden (Abb. 37h, i; 38A-D und 39a, b). Dieser schlitzförmige Blastoporus zieht sich über knapp 2/3 des Embryos, wobei die S4 Nachkommen etwa ihren posteriorsten Punkt markieren (Abb. 37i und 38D). Bilateral angeordnete Nachkommen der S1papxp gefolgt von Nachkommen der S1a beginnen sich von beiden Körperhälften über die Mitte der Blastoporusspalte zu schieben und diese zu überdecken (Abb. 37j und 38d', e'). Dabei wird die Blastoporusspalte, welche durch Einfaltung von Nachkommen der S1papxa und S1ppa entstand, abgeschnürt und bildet unter diesem einschichtigen Dachepithel ein einschichtiges Pharynxrohr (Abb. 39). Dachepithel und Pharynxrohr schließen sich reißverschlussartig zu beiden Polen der Rinne aber nur der anteriore Pol bleibt als primärer Durchbruch und späterer Mund erhalten (Abb. 37j, k und 38e', f'). Der hintere Teil des Pharynxrohres schließt direkt an das Darmepithel an und beide bilden ein durchgehendes „Versorgungstraktrohr“, wobei ein neuer sekundärer Durchbruch den Anus bildet (Abb. 37l). Körpermuskelzellen, welche von S2xpp und S3 abstammen, beginnen jeweils bilateralsymmetrisch links und rechts der Mittellinie und der linear angeordneten Nachkommen von S4 und P4 einzuwandern. (Abb. 38a', b'). Die Zellen tauchen unter das einschichtige Dachepithel und werden rechts und links der Blastoporusrinne und des entstehenden Versorgungstraktrohres nach anterior geschoben (Abb. 38c-f' und 39d). Dabei scheint Epibolie ausgehend von den Nachkommen der S2 die treibende Kraft zu sein, welche die Körpermuskelzellen ins Innere des Embryos schiebt (Abb. 38a-f). Nach dem Verschluss des hinteren Pols der Blastoporusrinne beginnt sich die von der S2 abstammende Hypodermis von posterior nach anterior wie ein Kondom über den Embryo zu schieben. Durch Interkalation und Abflachung der Zellen wird der Embryo länger und schmaler und nimmt schließlich die typische Wurmform an. Genauere Informationen zur Hypodermisentwicklung sind in Kapitel 4.3.15 enthalten.

Diese Beobachtungen lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

Die Gastrulation von *R. culicivox* hat Gemeinsamkeiten mit *C. elegans*, so kann ihr Beginn mit einer statt zwei Darmvorläuferzellen als einfache heterochrone Verschiebung (Raff, 1996) angesehen werden. Jedoch erinnert die Bildung des Pharynxrohres durch Abschnürung vom schlitzförmigen Blastoporus stark an Neurulation und wurde in dieser Form noch nicht bei den Nematoda beschrieben. Die auftretenden Gastrulationsbewegungen sind bei *R. culicivox* umfangreich, da die Zellen durch ihre vorwiegend monoklonale Abstammung geordnet im Embryo entstehen. Wohingegen der Zellstammbaum bei *C. elegans* scheinbar

chaotisch polyklonal aufgebaut ist, hierdurch jedoch Zellen so im Embryo lokalisiert sind, dass sie im Rahmen der Gastrulation und Morphogenese wenig wandern müssen.

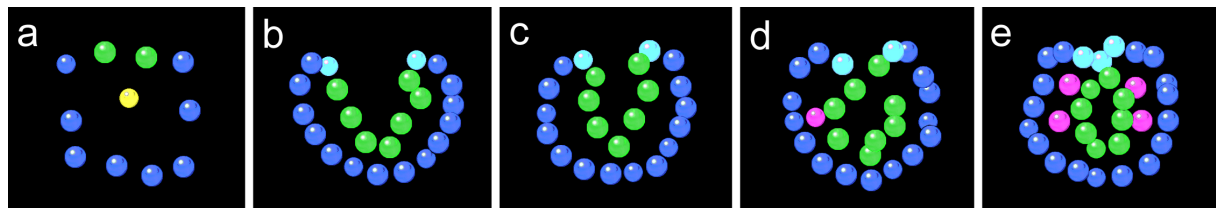


Abb. 39: Einfaltung des Pharynxrohres in *R. culicivora*

Die Abbildung stellt einen Querschnitt zu den in Abb. 38 dargestellten Prozessen da. Die Farbcodierung entspricht Abb. 36c. **a-c)** Blastoporusrinne entsteht durch Einfaltung von Nachkommen der Zellen S1paa, S1pap und S1ppa. **d)** Das Pharynxrohr wird abgeschnürt, **e)** Dachepithel überdeckt den Pharynx und die Körpermuskulatur, verlagert sich im Rahmen der Gastrulation nach innen und streckt sich durch anterior-posteriore Teilungen in den anterioren Bereich des Embryos.

4.3.13 Es gibt in *R. culicivora* keine Hinweise für eine Darminduktion

Bei *C. elegans* ist für die Determinierung des Darmschicksals in S2p ein induktiver Kontakt im frühen 4-Zell Stadium zwischen S2 und P2 essentiell (Berkowitz und Strome, 2000; Goldstein, 1992; Schierenberg, 1987). Unterbleibt dieser Kontakt, so verhalten sich beide Tochterzellen der S2 wie MS und es entsteht kein Darm.

Um zu testen, ob die in Kapitel 4.3.10 beschriebene Darmabstammung und die in Kapitel 4.3.12 beschriebenen Gastrulationsereignisse und Organogenese durch Zell-Zell Interaktionen oder zellautonom beeinflusst werden, wurden Laserablationsexperimente durchgeführt. Für die Analyse sind Autofluoreszenz und doppelbrechende Darmgranula im unmanipulierten Embryo von *R. culicivora* (Abb. 40g-i) sowie in *C. elegans* (Laufer et al., 1980) ein sicheres Zeichen für Darmdifferenzierung.

Embryonen von *R. culicivora* wurden nach der Laserablation von P1 in Bezug auf Gastrulationsverhalten und Darmzelldifferenzierung untersucht. Dabei konnten neben der normalen Musterbildung (Abb. 31), der Ausbildung von dotterfreien Kappen in S1a und S1p (Abb. 34a-d) und den Unterschieden im Zellteilungsrhythmus auch typische Gastrulationsprozesse unter Ausbildung eines Blastoporus (Abb. 40a) beobachtet werden (n=8). Die Nachkommen der S1 entwickelten sich zu einem deutlich ausgeprägten zweischichtigen Epithel (Abb. 40b) mit einer „Mundhöhle“ und einer röhrenförmigen „pharynxartigen“ Struktur (Abb. 40c). Untersuchungen des terminalen Phänotyps zehn Tage nach Ablation der P1 (Abb. 40d) zeigen das Vorhandensein von doppelbrechenden Darmgranula (Abb. 40e) und Autofluoreszenz (Abb. 40f) in einem Teil der eingewanderten Zellen. Eine Muskelkontraktion als Zeichen von Körpermuskeldifferenzierung konnte hingegen im terminalen Phänotyp nicht beobachtet werden. Die Nachkommen der S1 im

manipulierten Embryo (Abb. 56b') scheinen wie im unmanipulierten Embryo zu spezifischen Geweben beizutragen (Abb. 56b).

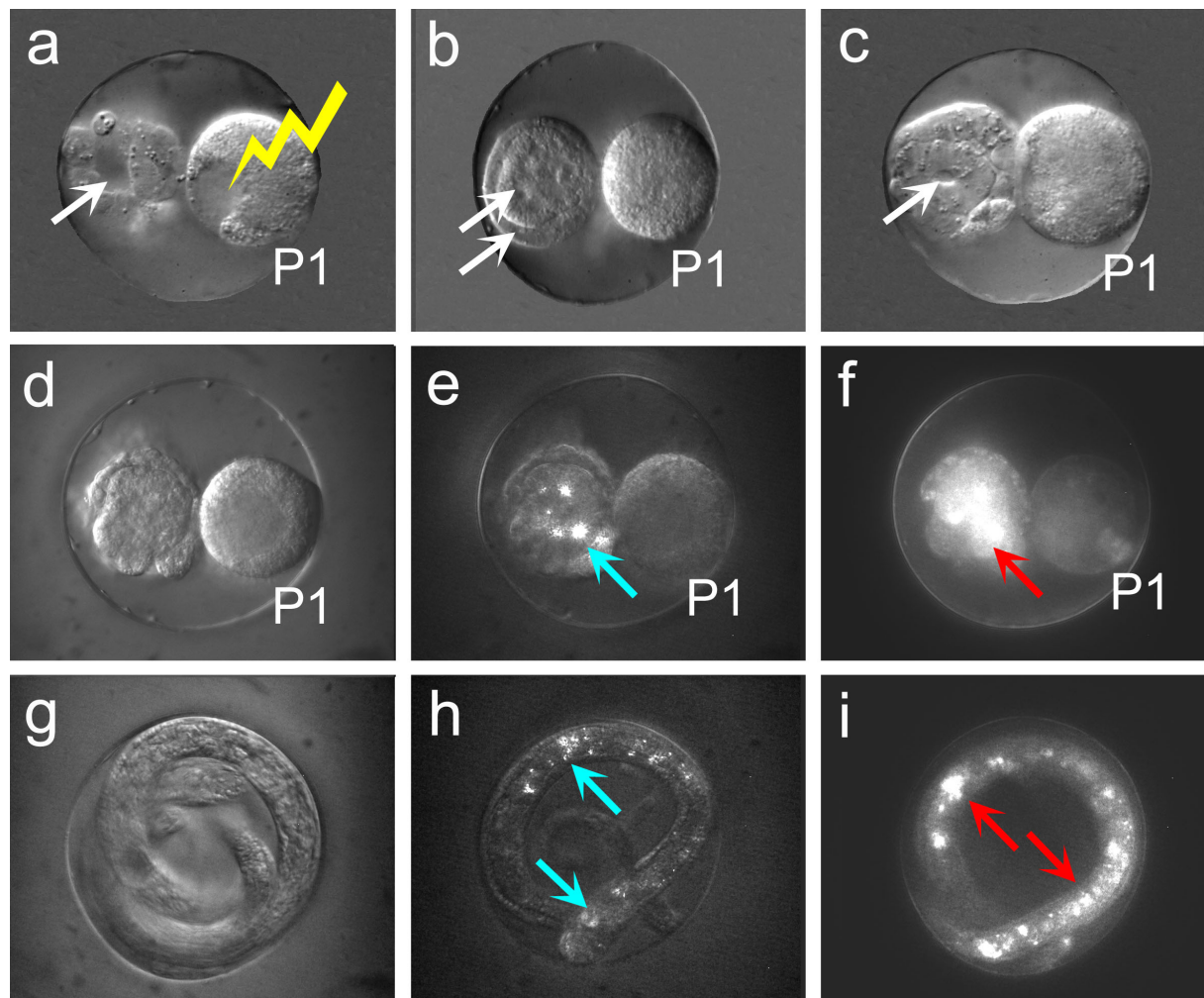


Abb. 40: Gastrulation und Darmentwicklung nach Ablation von P1

Nach Ablation von P1 (**gelber Blitz**) im frühen 2-Zell Stadium von *R. culicivora* teilt sich die Keimbahnzelle nicht weiter. **a)** Die Nachkommen der überlebenden Zelle S1 wandern durch einen Blastoporus (Pfeil) ins Innere **b)** und es bildet sich ein zweilagiges Epithel (Pfeile). **c)** Schließlich entsteht eine Struktur, welche an Pharynx und Mundhöhle (Pfeil) erinnert. **d)** Im terminalen Phänotyp sind nach zehn Tagen Entwicklung **e)** doppelbrechende Granula (**blaue Pfeile**) und **f)** Autofluoreszenz (**rote Pfeile**) nach UV Anregung Indikatoren einer Darmzellendifferenzierung. **g-h)** Der terminale Phänotyp eines unmanipulierten Embryos zeigt nach zehn Tagen Entwicklung ebenfalls doppelbrechende Granula und Autofluoreszenz in den Darmzellen. **Orientierung:** anterior links, Ventralansicht.

Diese Beobachtungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Gastrulationsprozesse und Schicksalsdeterminationen in den Nachkommen von S1 zellautonom und unabhängig von Induktionen durch P1 oder deren Nachkommen sind.

4.3.14 Ablation der RFM beeinträchtigt Gastrulation und Zelldifferenzierung

Um zu testen, ob die in Kapitel 4.3.10 beschriebene Darmabstammung und die in Kapitel 4.3.12 beschriebenen Gastrulationsereignisse und Organogenese möglicherweise durch die RFM (Kapitel 4.3.7) beeinflusst werden, wurden Laserablationsexperimente durchgeführt.

Embryonen von *R. culicivora* wurden nach der Laserablation der RFM in Bezug auf Gastrulationsverhalten und Darmzelldifferenzierung untersucht. Dabei konnten neben den in Kapitel 4.3.8 beschriebenen symmetrischen Zellteilungen auch keine Gastrulation oder Darmzelldifferenzierung festgestellt werden (n=3).

In den beobachteten manipulierten Embryonen trat nur in einer Tochterzelle von S1 eine sichtbare dotterfreie Kappe auf. Aufgrund der Lage der Kappe gegenüber dem Midbody der S1 Teilung wird diese Zelle formell als „S1a“ bezeichnet, in „S1p“ tritt keine Kappe auf (Abb. 41a). Die Zellzyklen der S1 Nachkommen sind etwas schneller als die der P1 Nachkommen. Im 16-Zell Stadium entsteht eine einlagige Blastula mit kleinem Blastocoel, alle Nachkommen der S1 bzw. P1 sind gleichgroß und es wandert keine Darmvorläuferzelle ein. Während der weiteren Entwicklung lassen sich nur kleine Unterschiede in der Zellzykluslänge innerhalb der Nachkommen der S1 und P1 feststellen, jedoch unterbleibt die Bildung von Zellgruppen mit unterschiedlichen Zellzykluslängen. Es treten keine asymmetrischen Zellteilungen auf, lediglich zwischen den S1 und P1 Nachkommen kann ein Unterschied in der Zellgröße beobachtet werden, da letztere zum Teil eine Zellteilungsrunde zurück liegen (Abb. 41b-f). Das Blastocoel nimmt im Laufe der Entwicklung weiter an Volumen zu, während die Blastula einlagig bleibt (Abb. 41b-i). Auch das Einwandern potentieller Muskelzellen unterbleibt, die entsprechenden Nachkommen der P1 verbleiben an der Oberfläche (Abb. 41f). Etwa mit dem 128-Zell Stadium beginnt vom anterioren Pol aus, sich bei zwei Embryonen eine Einfaltung ausgehend vom anterioren Bereich des Embryos entlang der Mittellinie einzuschnüren (Abb. 41e, g, h), während ein dritter Embryo in diesem Stadium stecken blieb.

Es entsteht eine einlagige Blastula mit großem Blastocoel in polarer anterior-posteriorer Ausrichtung und einer Einschnürung im anterioren Bereich (Abb. 41h), welche aber keine Pharynxröhre bildet. Als terminaler Phänotyp entsteht aufgrund der Streckung in der Eischale eine etwa 400-500-Zell Blastula (Abb. 41i), welche aufgrund ihrer äußeren Form und Streckung innerhalb der Eischale an ein „Morphogenesestadium“ erinnert. Nach zehn Tagen Entwicklung konnten weder doppelbrechende Darmgranula oder Autofluoreszenz als Zeichen von Darmdifferenzierung beobachtet werden noch Muskelkontraktion.

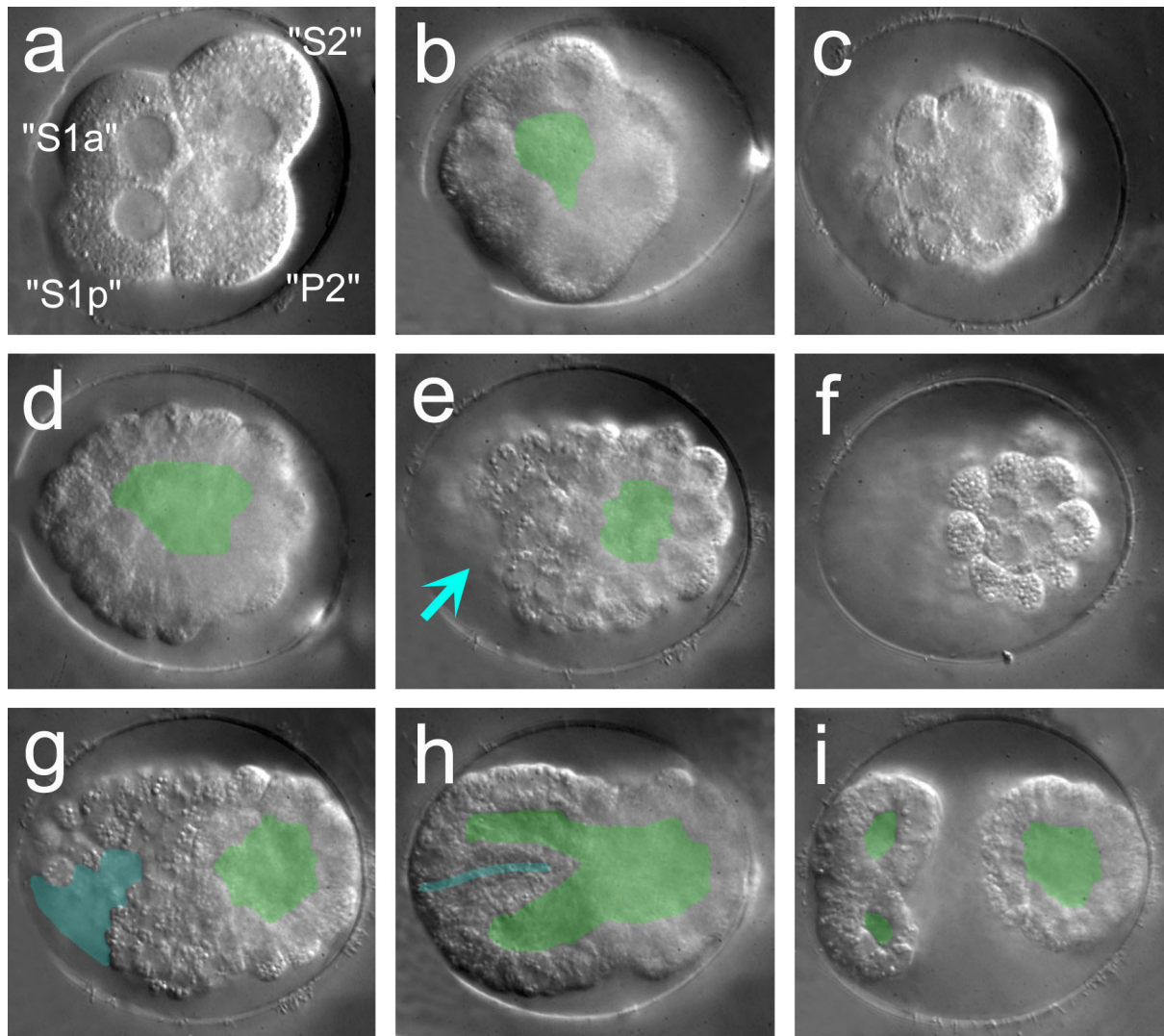


Abb. 41: Ablation der RFM führt zum Verlust von Gastrulationsereignissen

a) Nach Ablation der RFM bildet sich ein 4-Zell Stadium mit gleichgroßen Zellen. **b-f)** Es bildet sich eine einlagige Blastula mit großem Blastocoel aus, jedoch treten weder asymmetrische Teilungen noch Zelleinwanderungen auf. **e, g)** In den optischen Schnitten ist nur ein Teil des die einlagige Blastula ausfüllenden Blastocoels angeschnitten. **e-h)** Vom anterioren Pol beginnt sich eine Einschnürung bis zur Mitte des Embryos auszubilden. **i)** Nach weiteren Zellteilungen verbiegt sich der Embryo in der Eischale zu einem einlagigen 400-500-Zell „Morphogenesestadium“. **grün:** Blastocoel, **blau:** blastoporusartige Einfaltung.

Diese Beobachtungen lassen die Schlussfolgerungen zu, dass das Darmschicksal zwar einerseits zellautonom festgelegt wird, andererseits aber von der RFM abhängig ist. Nach laserinduzierter Ablation der RFM bildet sich eine einlagige Blastula mit großem Blastocoel aus, bei welcher zwar Morphogenese einsetzt, jedoch wichtige entwicklungsbiologische Prozesse wie die Pharynx-, Darm- und Körpermuskel- Differenzierung, Zelleinwanderung und Organogenese unterbleiben.

4.3.15 Hypodermisentwicklung – Ausbildung von repetitiven Elementen

Die Hypodermis in *C. elegans* ist essentiell für die Morphogenese, durch Verzahnung und Abflachung von Zellreihen breiten sich die Zellen über den Embryo aus (Epibolie) und formen aus einem ovalen Zellhaufen eine wurmförmige Larve (Simske und Hardin, 2001; Strome und Wood, 1983). Dabei ist eine komplett geschlossene Hypodermis von essentieller Bedeutung, da sich im letzten Drittel der Embryogenese ein hydrostatischer Druck (Hydroskelett) gegen die Hypodermis aufbaut und der Embryo bei defekter Hypodermis platzt.

Um die Entstehung der Hypodermis in *R. culicivora* während der Embryogenese zu untersuchen, wurden 4D-Aufnahmen (Abb. 37) analysiert und 3D-Kugelmodelle (Abb. 38) erstellt.

Anders als bei *C. elegans* stammt die Hypodermis in *R. culicivora* monoklonal von der Gründerzelle S2 ab. In drei aufeinander folgenden transversen Teilungen gehen aus ihr acht Zellen hervor, die sich als Ring bilateralsymmetrisch um die Mittellinie des Embryos anordnen (Abb. 42a-a'). Alle acht Zellen dieses Ringes teilen sich in anterior-posteriorer Orientierung, so dass zwei Ringe von je acht Zellen entstehen (Abb. 42c, c'). Die jeweils zwei ventralen bilateralsymmetrisch liegenden Zellen beider Ringe (Abb. 38a, a') beginnen im Rahmen der Gastrulation ins Innere des Embryos einzuwandern und ihre Nachkommen tragen zur Körpermuskulatur bei. In einer weiteren anterior-posterioren Teilungsrunde verdoppeln sich die verbleibenden sechs Zellen jedes Ringes erneut, so dass vier Ringe entstehen (Abb. 42d, d'). Bis zum Erreichen dieses 4-Hypodermisring Stadiums ist der Embryo absolut bilateralsymmetrisch aufgebaut. Bei der Teilung der 4-Hypodermisringe ist die Orientierung der Teilungsspindeln zwar nach wie vor in anterior-posteriorer Orientierung, jedoch werden nur in einem Teil der Embryonen (3/11) perfekt geformte acht Ringe gebildet (Abb. 42e, e').

In den restlichen Embryonen (8/11) beginnen sich die Zellen mit der Teilung zum 8-Hypodermisring Stadium gegeneinander zu verschieben. Schließlich beginnen sich die Zellen ineinander zu verzahnen und abzuflachen, was zusätzlich die Abweichung vom perfekten Ringmuster noch erhöht und die bilaterale Symmetrie innerhalb der Hypodermiszellen verwischt. Mit der nächsten Teilungsrunde der Hypodermiszellen, die erneut vorwiegend in anterior-posteriorer Orientierung erfolgt, ist die Anordnung der S2 Nachkommen zwischen den einzelnen Embryonen variabel und es kann kein deutliches Ringmuster mehr erkannt werden.

Die entstandenen 96 Hypodermiszellen (Abb. 42f) beginnen sich ineinander zu verzahnen, sich in Reihen entlang der anterior-posterioren Körperachse des Embryos zu orientieren, dann abzuflachen und sich dadurch weiter über den Embryo auszubreiten. Die Zellen der einzelnen Reihen teilen sich transvers (Abb. 43a, b, e). Durch Interkalation und anschließende Abflachung der gerade entstandenen Schwesterzellen streckt sich die

Hypodermis über den Embryo aus (Abb. 43d, f). Dabei ist die Abfolge, wie die Zellen miteinander interkalieren, leicht variabel, so dass nicht immer Zellen abwechselnd von links und rechts eine neue Reihe bilden (schwarze Pfeile; Abb. 43c, f).

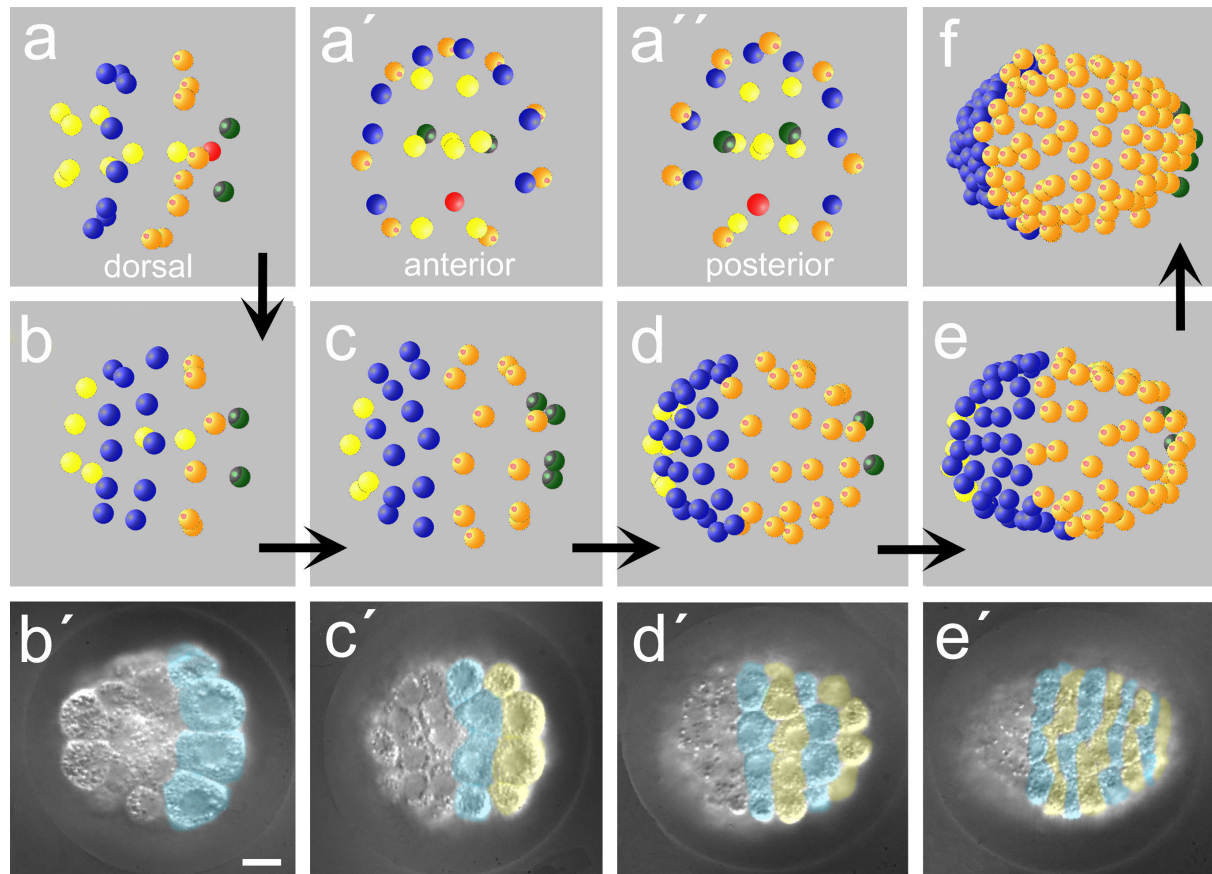


Abb. 42: Hypodermisorganisation in repetitiven Elementen

a-a'') Durch drei aufeinander folgende transverse Teilungen der S1a und S2 entsteht eine ringförmige Anordnung derer Tochterzellen. Darauf folgende anterior-posteriore Teilungen führen zur Vervielfältigung dieser Ringe entlang der anterior-posterioren Körperachse. **b)** Zwei S1a Ringe. **c)** Zwei S2 Ringe. **d)** Vier S1a und vier S2 Ringe. **e)** Acht S2 Ringe. **f)** Mit Teilung von acht nach sechzehn S2 Ringen verschmelzen diese und sind nicht mehr voneinander abgegrenzt. **b')** S2 Ring, wovon sich jede Zelle des Ringes entlang der anterior-posterioren Körperachse in eine anteriore (blau) und posteriore (gelb) Tochterzelle teilt **c')** und somit zwei S2 Ringe, **d')** vier S2 Ringe, **e')** acht S2 Ringe entstehen. a-h) 3D-Rekonstruktion; **dunkelblau:** S1a, **gelb:** S1p, **orange:** S2, **dunkelgrün:** S3, **rot:** P3. b'-e') zu den 3D-Rekonstruktionen korrespondierende DIC Aufnahmen; Hypodermisringe abwechselnd in **blau** und **gelb** eingefärbt. **Orientierung:** a', a'') dorsal oben, a-f) anterior links, Dorsalansicht. **Eichstrich:** 10µm.

Auf der Ventralseite des Embryos beginnen etwa ein Dutzend Zellen aus dem Hypodermisverband, deren S2-Zellstammbaumherkunft je nach betrachtetem Embryo leicht variiert, einzuwandern. Ihr genaues Schicksal konnte nicht sicher bestimmt werden, möglicherweise tragen sie zum ventralen Nervenstrang bei (Abb. 38 f').

Der beschriebene Prozess der Ringbildung und Verdopplung kann ebenfalls in S1a und den daraus entstehenden Neuronen beobachtet werden. In drei aufeinander folgenden rechts-links Teilungen gehen aus ihr acht Zellen hervor, die sich als Ring bilateralsymmetrisch um

die Mittellinie des Embryos anordnen (Abb. 42a-b). Alle acht Zellen dieses Ringes teilen sich in zwei aufeinander folgenden anterior-posterioren Teilungen, so dass erst zwei Ringe (Abb. 42b b', c, c') und schließlich vier Ringe (Abb. 42d, d') mit jeweils bilateralsymmetrisch angeordneten Zellen entstehen. In weiteren Teilungen beginnen sich diese Zellen allerdings stärker und schneller, als innerhalb der Hypodermis beobachtet, gegeneinander zu verschieben, so dass auch hier die bilaterale Symmetrie undeutlich wird.

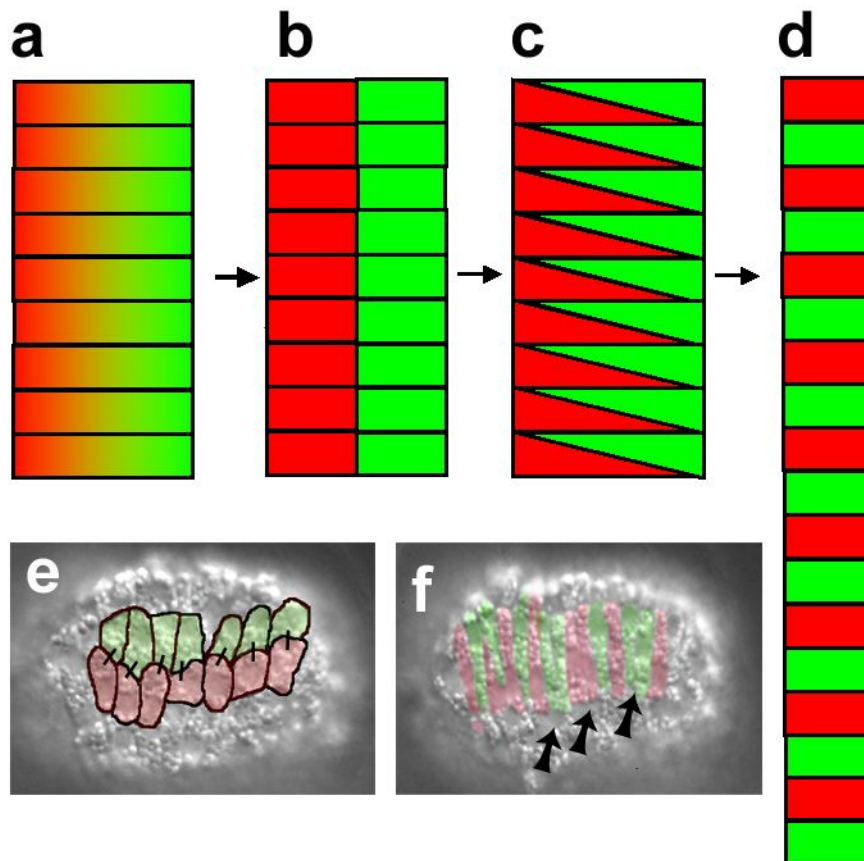


Abb. 43: Verzahnung der Hypodermiszellen

a-b) Eine Reihe dorsaler Hypodermiszellen teilt sich transversal in eine rechte und eine linke Reihe. **c)** Die Zellen beider Reihen beginnen sich ineinander zu verzahnen. **d)** Es bildet sich eine lange Reihe, was zur Streckung der Hypodermis entlang der anterior-posterioren Körperachse bei gleichzeitiger Verringerung des embryonalen Umfangs führt. **e-f)** DIC Aufnahmen zeigen die linken (rot) und rechten (grün) Schwesterzellen (durch Striche Verbunden), welche nach der Verzahnung in einer Reihe liegen. Dabei können auch zwei Zellen von einer Seite nebeneinander zum liegen kommen (schwarze Pfeile). **Orientierung:** a-d) anterior oben, Dorsalansicht. e-f) anterior links, Dorsalansicht.

Diese Beobachtungen einer ringförmigen Anordnung von Hypodermis und Neuronen deuten auf ein anderes Prinzip der Organogenese als bei *C. elegans* hin. Dieses Zellverhalten erinnert mehr als alle anderen bisher beobachteten Musterbildungsprozesse bei Nematoden an Segmentierung. Zwischen einzelnen Embryonen wurde jedoch eine Variabilität in der Anordnung von neuronalen- und Hypodermis-Zellen beobachtet. Zusätzlich wanderten in verschiedenen Embryonen unterschiedliche Zellen aus dem ventralen Hypodermisverband

ins Innere ein. Dies deutet darauf hin, dass Zellschicksale innerhalb des Hypodermisverbandes nicht ausschließlich zellstammbaumabhängig, sondern auch positionsabhängig, z.B. durch sekundäre schicksalsdeterminierende Induktionen festgelegt werden. Diese Vorstellung wird auch durch den Befund unterstützt, dass die zwei ventralen Zellen des ersten Hypodermisringes Körpermuskulatur bilden.

4.4 Untersuchungen an Vertretern der Dorylaimia

Die gewonnenen Erkenntnisse über *R. culicivorax* (Clade 2) und der untersuchten Chromadorea (Claden 3-12) aus dieser Arbeit unterstreichen, dass *C. elegans* nicht als repräsentativ für das gesamte Taxon der Nematoda angesehen werden kann. Es bleibt jedoch zu überprüfen, ob *R. culicivorax* repräsentativ für die Dorylaimia (Clade 2) ist. Nur wenige Arbeiten beschäftigen sich überhaupt mit embryologischen Fragestellungen an Vertretern dieser Gruppe. So ist die erste Zellteilung (außer bei den *Trichinellida*; siehe *T. muris* und Ewald, 2007; Malakhov, 1994) symmetrisch, bei allen ist eine Trennung von Keimbahn und Soma zu erkennen und der Darm stammt wie in *R. culicivorax* von der Gründerzelle S1 ab (Malakhov, 1994), 4D Analysen wurden jedoch bisher nicht durchgeführt. Interessanterweise ist die erste Zellteilung bei den Trichinellida wie *Trichuris muris* und *Trichinella spiralis* stark asymmetrisch in eine extrem kleine somatische Gründerzelle S1 und eine große Keimbahnzelle P1 (Ewald, 2007; Malakhov, 1994).

Um zu überprüfen, ob sich die aus *R. culicivorax* gewonnenen Erkenntnisse auf andere Vertreter der Dorylaimia übertragen lassen, ob sich deren Embryonalentwicklung mit seiner Hilfe besser verstehen lässt und außerdem um zu prüfen, ob es sich um einen repräsentativen Modellorganismus innerhalb der Dorylaimia handelt, wurde mit der Untersuchung von *Prionchulus sp.*, *Dorylaimus sp.* und *Trichuris muris* begonnen.

4.4.1 Untersuchungen an *Prionchulus sp.*

Der Embryo von *Prionchulus sp.* füllt seine umgebende Eischale fast vollständig aus (Abb. 44a und 45a). Wie bei *R. culicivorax* teilt sich P0 symmetrisch (Abb. 44a und 45b), aber die weiteren Teilungen der Keimbahn verlaufen stammzellartig asymmetrisch in einer Reihe entlang der anterior-posterioren Körperachse, wobei eine Polaritätsumkehr der Keimbahn in P1 beobachtet werden kann (Abb. 44 und 45m). Wie bei *R. culicivorax* kommt es bei *Prionchulus sp.* zu einer linearen Ausrichtung der Teilungsspindeln in P1 und S1 (Abb. 44B, b), welches jedoch aufgrund der Platzverhältnisse innerhalb der Eischale auch nicht in ein lineares, sondern in ein rhombusförmiges 4-Zell Stadium übergeht (Abb. 44d und 45d). S1p, S1pp, S1ppp, S4 und P4 liegen ebenfalls in longitudinaler Orientierung und bilden die an der Oberfläche einer kompakten Morula liegende Mittellinie des Embryos. Wie bei *R. culicivorax* sind die Teilungen von S1, S1p und S1pp asymmetrisch, wobei die jeweilige Darmvorläuferzelle größer als ihre Schwesterzelle ist (Abb. 45c, m). Die Zellstammbaumanalysen von *Prionchulus sp.* zeigen, dass S1p den ventralen Bereich und S2 den dorsalen Bereich entlang der dorso-ventralen Körperachse wie bei *R. culicivorax* definiert (Kapitel 4.3.6), deren Polarität relativ zu *C. elegans* umgekehrt ist.

Die Gastrulation von *Prionchulus sp.* beginnt mit der Einwanderung der Darmvorläuferzelle S1ppp (Abb. 45f, n), ohne vorherige Formation einer Blastula, eines Blastocoels oder kleiner flüssigkeitsgefüllter Hohlräume zwischen einzelnen Zellen. Die Darmvorläuferzelle stammt wie bei *R. culicivora* von S1 ab. Die Keimbahnzelle P4 folgt dem Darm ins Innere. Als Folge ihrer Einwanderung entsteht ein ovaler Blastoporus genau auf der ventralen Mittellinie (Abb. 45h). Wie bei *R. culicivora* beginnt sich bei *Prionchulus sp.* der Blastoporus durch Zelleinfaltungen in anteriorer Richtung auszudehnen und eine Blastoporusspalte zu bilden (Abb. 45i). Dieser schlitzförmige Blastoporus zieht sich über knapp 2/3 des Embryos und Zellen von beiden Körperhälften beginnen sich über die Mitte der Rinne zu schieben und diese zu überdecken (Abb. 45j). Ausgehend von der Mitte schließt sich die Blastoporusspalte reißverschlussartig zu beiden Polen und nur zwei kleine Öffnungen bleiben als primärer Durchbruch (Abb. 45k) und späterer Mund und voraussichtlich Anus erhalten (Abb. 45l).

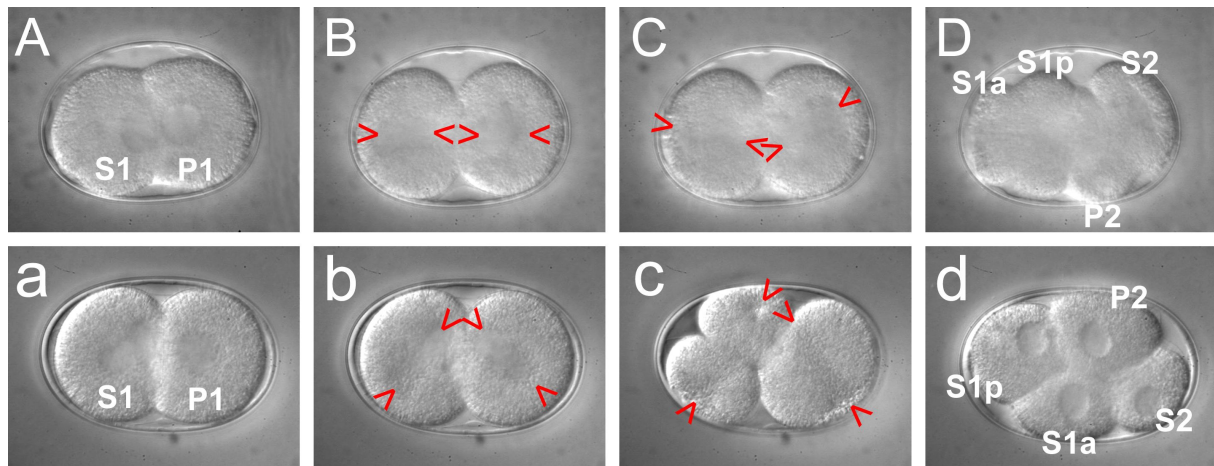


Abb. 44: Frühe anterior-posteriore Ausrichtung der Teilungsspindeln in *Prionchulus sp.*

Frühentwicklung von zwei Embryonen von *Prionchulus sp.* **A, a)** Die Teilung der P0 resultiert in zwei symmetrischen Tochterzellen S1 und P1. **B, b, C, c)** Die Teilungsspindeln in beiden Zellen sind longitudinal zueinander orientiert und resultieren in **D)** einem transienten linearen Arrangement, **d)** welches aufgrund der begrenzenden Eischale in ein rhombusförmiges 4-Zell Stadium übergeht. **Orientierung:** anterior links.

Die frühe Musterbildung von *Prionchulus sp.* ist zwar sehr ähnlich zu der von *R. culicivora* (Abb. 31a-d), jedoch unterbleibt bei *Prionchulus sp.* die Ausbildung von Ringen oder repetitiven Elementen. Vorläufige Zellstammbaumanalysen (nicht gezeigt), deuten darauf hin, dass die Zellschicksale im Embryo von *Prionchulus sp.* zwar bilateralsymmetrisch, rechts und links der Mittellinie angeordnet sind, diese aber nicht von äquivalenten Zellstammbaumzweigen abstammen. Dies könnte wie bei *Plectus sp.* (ES601; Kapitel 4.2.1) auf einen positionsabhängigen Mechanismus zur Zellspezifizierung hinweisen. Offenbar anders als bei *R. culicivora* stammt die Hypodermis nicht monoklonal von S2 ab, sondern von mehreren Zellstammbaumzweigen.

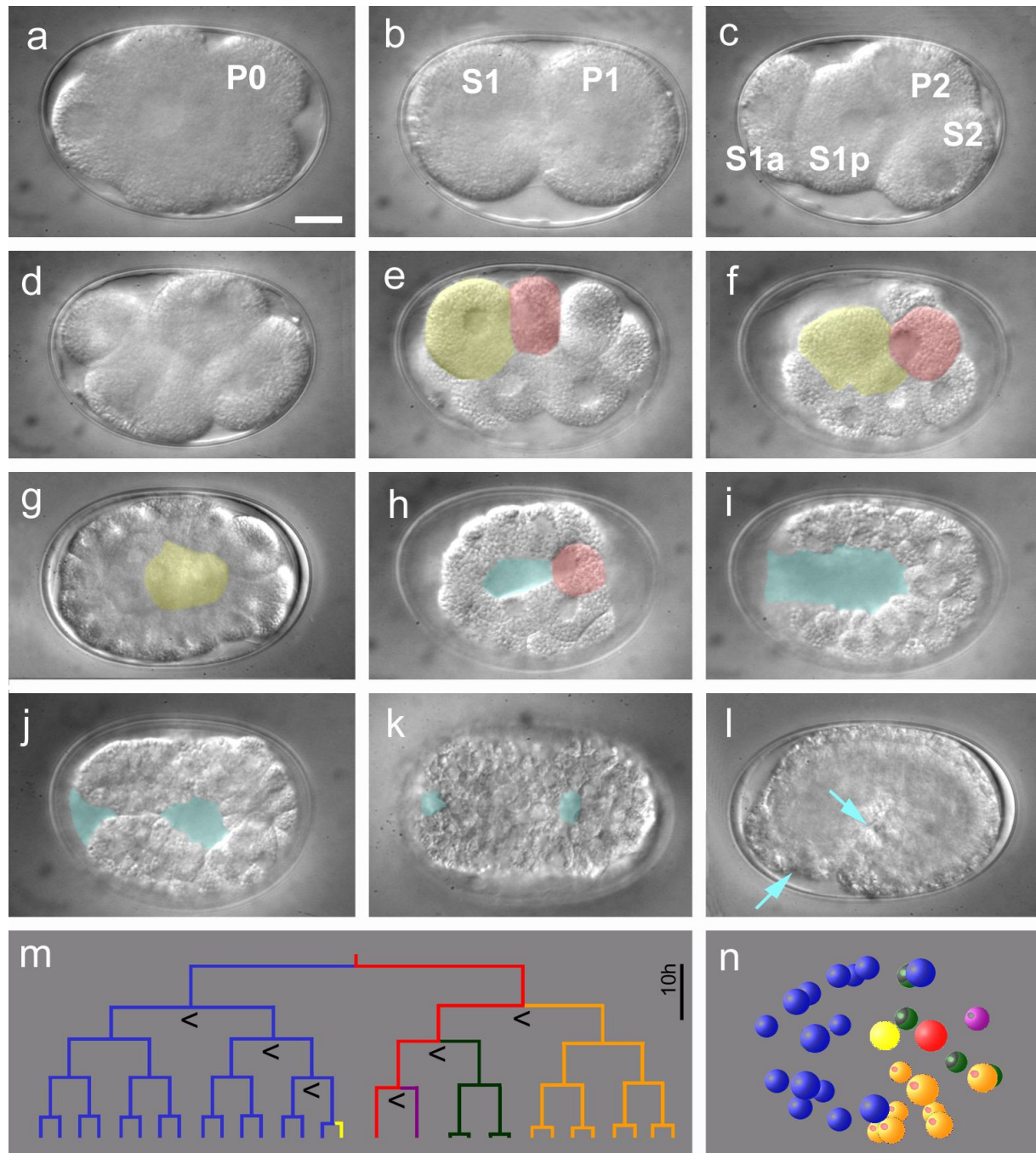


Abb. 45: Die Embryogenese von *Prionchulus* sp.

a-d) 1-Zell bis 4-Zell Stadium, Zellteilung von P0 resultiert in symmetrischen Tochterzellen. **e)** Die Darmvorläuferzelle (gelb) markiert den ventralen Pol. **f-g, n)** Gastrulationsbeginn, Darmvorläufer (gelb) wandert ein und teilt sich. P4 folgt, teilt sich später entlang der anterior-posterioren Körperachse. Es ist kein Blastocoel vorhanden. **h-k)** Durch Zelleinwanderungen streckt sich der Blastoporus schlitzförmig entlang der anterior-posterioren Körperachse über 2/3 des Embryos, beginnt ausgehend von seiner Mitte sich reißverschlussartig zu beiden Polen zu schließen und nur zwei punktförmige Öffnungen bleiben als primäre Durchbrüche erhalten **l)** und scheinen Mund und voraussichtlich Anus zu bilden (blaue Pfeile). **m)** Früher Zellstammbaum, in einer Reihe von stammzellähnlichen asymmetrischen (<>) Zellteilungen entstehen die Gründerzellen S1-S4, P4, Polaritätsumkehr tritt in P1 auf. **n)** 3D Kugelmodell des Embryos zeigt keine bilaterale Symmetrie. **Farbkodierung:** siehe Abb. 6. **Orientierung:** anterior links, a-d, l) linke Lateralansicht, e-k) Ventralansicht. **Eichstrich:** 10µm.

4.4.2 Untersuchungen an *Dorylaimus sp.*

Die hier zusammengestellten Beobachtungen zu *Dorylaimus sp.* stammen aus meiner Analyse zweier Videoaufnahmen, welche im Rahmen einer Staatsexamensarbeit (Gödde 2000) angefertigt wurden. Anders als bei *R. culicivora* teilt sich P0 von *Dorylaimus sp.* asymmetrisch, dabei ist S1 etwas kleiner als ihre Schwester P1 (Abb. 46b, m). Die weiteren Teilungen der Keimbahn verlaufen stammzellartig asymmetrisch in einer Reihe entlang der anterior-posterioren Körperachse, wobei eine Polaritätsumkehr in P1 beobachtet werden kann (nicht gezeigt; Abb. 46m). Im Gegensatz zu *R. culicivora* kommt es bei *Dorylaimus sp.* zu einer transversen Ausrichtung der Teilungsspindeln in P0 ($n=2$; Abb. 46a') mit anschließender Rotation der Blastomeren. Möglicherweise handelt es sich hierbei lediglich um eine heterochrone Verschiebung der auch bei *C. elegans* zu beobachtenden Rotation der frühen Teilungsspindel (von Ehrenstein und Schierenberg 1980). Eine Aussage zur Orientierung der Teilungsspindeln in den weiteren Zellteilungen kann aufgrund der Aufnahmequalität nicht getroffen werden. Nach der Teilung von S1 und P1 entsteht ein typisch rhombusförmiges 4-Zell Stadium (Abb. 46c). Wie bei *R. culicivora* teilen sich S1p, S1pp, S1ppp, S4 und P4 ebenfalls in longitudinaler Orientierung entlang der ventralen Mittellinie des Embryos. Die Gastrulation von *Dorylaimus sp.* beginnt mit der Einwanderung der Darmvorläuferzelle S1ppp ohne vorherige Formation einer Blastula oder eines Blastocoels. Aufgrund der Aufnahmequalität können flüssigkeitsgefüllte Hohlräume jedoch nicht ausgeschlossen werden (Abb. 46e). Die durchgeführten Zellstammbaumanalysen von *Dorylaimus sp.* zeigen, dass S1p den ventralen Bereich und S2 den dorsalen Bereich entlang der dorso-ventralen Körperachse einnehmen, die Polarität dieser Körperachse somit wie bei *R. culicivora* und *Prionchulus sp.* relativ zu *C. elegans* umgekehrt ist.

Ein Vergleich der frühen Musterbildung zwischen *Dorylaimus sp.* und *R. culicivora* zeigt keine wesentlichen Unterschiede auf (Abb. 31a-d), jedoch kann in der weiteren Entwicklung von *Dorylaimus sp.* keine Ausbildung von Ringen oder repetitiven Elementen beobachtet werden. Da die Aufnahmen relativ früh enden (Abb. 46f) können keine weiterführenden Aussagen zum Zellstammbaum, der bilateralen Symmetrie oder der Bildung von Mund und Anus gemacht werden.

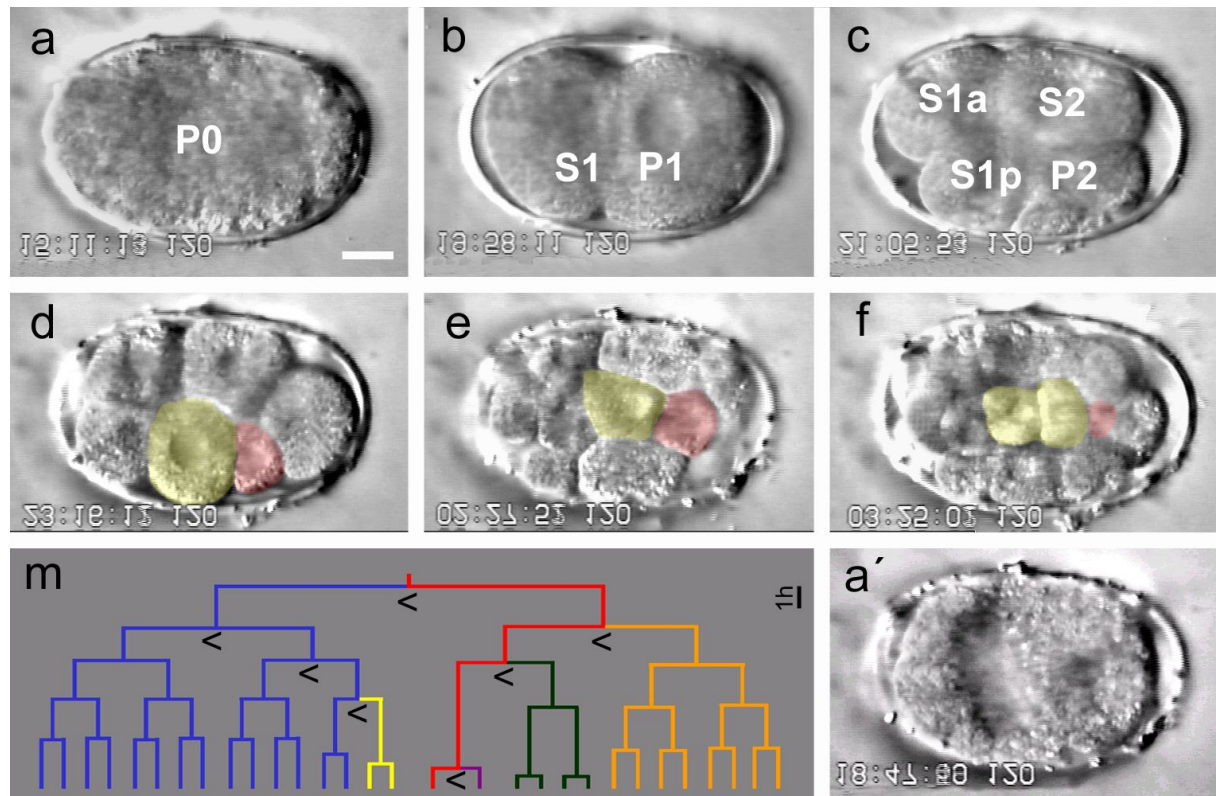


Abb. 46: Embryogenese von *Dorylaimus* sp.

Die Videodaten dieser Kollage stammen von Thomas Gödde (2000). **a-c)** 1-Zell bis 4-Zell Stadium. **e)** Die Darmvorläuferzelle S1ppp (gelb) markiert den ventralen Pol. **d-f)** Gastrulationsbeginn, Darmvorläufer S1ppp (gelb) wandert ein und teilt sich. P4 folgt, teilt sich später entlang der anterior-posterioren Körperachse. Es ist kein Blastocoel vorhanden. **a')** Teilungsspindel in P0 ist transvers zur Längsachse des Eies ausgerichtet. **m)** Früher Zellstammbaum, in einer Reihe von stammzellähnlichen asymmetrischen (<>) Zellteilungen entstehen die Gründerzellen S1-S4, P4, Polaritätsumkehr tritt in P1 auf. **Farbkodierung:** s. Abb. 6. **Orientierung:** anterior links, a-d, l) linke Lateralansicht, e-k) Ventralansicht. **Eichstrich:** 10µm.

4.4.3 Untersuchungen an *Trichuris muris*

Der Embryo von *Trichuris muris* ist von einer extrem stabilen, zitronenförmigen Eischale umgeben (Abb. 48a). Anders als bei *R. culicivora* teilt sich die P0 auffällig asymmetrisch, wobei in der Literatur angegeben wird, dass es sich bei der kleineren der beiden Tochterzellen um die somatische Gründerzelle S1, bei der größeren Tochterzelle um die Keimbahn P1 handelt (Malakhov, 1994). Die 4D-Analysen zeigen jedoch, dass es sich bei der kleineren der beiden Tochterzellen um P1 und bei der großen Tochterzelle um S1 handelt (Abb. 48b). Interessanterweise liegt die Keimbahn in *T. muris* anfänglich anders als bei allen bisher untersuchten Nematoda im anterioren Bereich des Embryos, was formal als eine Polaritätsumkehr der Keimbahn in P0 gedeutet werden kann (Abb. 48m). Die weiteren Teilungen der Keimbahn verlaufen stammzellartig asymmetrisch in einer Reihe entlang der anterior-posterioren Körperachse, wobei eine Polaritätsumkehr in P1 beobachtet wird, so dass die somatischen Gründerzellen anterior der Keimbahn entstehen (Abb. 48b-f, m). Anders als bei *R. culicivora* und den beschriebenen Dorylaimia können bei *T. muris* jedoch

keine asymmetrischen Zellteilungen in den Nachkommen der somatischen Gründerzellen beobachtet werden (nicht gezeigt; Abb. 48m). Obwohl die Keimbahn anfänglich im anterioren Bereich des Embryos lokalisiert ist, kommt es im Rahmen der Embryogenese zu massiven Zellrearrangements und die Keimbahn kommt mit dem Beginn der Gastrulation zentral zu liegen (Abb. 47 und 48j). Der Darm in *T. muris* stammt wie bei allen bisher beobachteten Nematoda monoklonal von einer Darmvorläuferzelle ab. Während diese Darmvorläuferzelle in den beschriebenen Chromadorea jedoch aus S2 und in *R. culicivora* und den anderen bisher beschriebenen Dorylaimia aus S1 hervorgeht, stammt sie in *T. muris* von der Gründerzelle S3 ab und diese trägt ausschließlich zum Darm bei (Abb. 48m). Durch die longitudinalen Teilungen von Keimbahnzellen und Darmvorläuferzelle wird die Mittellinie des Embryos definiert (Abb. 48n).

Die Gastrulation von *T. muris* beginnt mit der Einwanderung der Darmvorläuferzellen S3a und S3p nach vorheriger Formation eines kleinen Blastocoels (Abb. 48g-j). Die Keimbahnzelle P4 und die somatische Gründerzelle S4 folgen den Darmvorläuferzellen ins Innere. Als Folge ihrer Einwanderung entsteht ein ovaler Blastoporus genau auf der ventralen Mittellinie (Abb. 48k), welcher schließlich von Zellen überwachsen wird. Mund und Anus entstehen jeweils durch einen neuen sekundären Durchbruch (Abb. 48l).

Die frühe Musterbildung von *Trichuris muris* unterscheidet sich deutlich von *R. culicivora* oder den bisher beschriebenen Dorylaimia und die Ausbildung von Ringen oder repetitiven Elementen kann nicht beobachtet werden. Die vorläufigen Zellstammbaumanalysen zeigen, dass sich die Zellschicksale im Embryo bilateralsymmetrisch anordnen und die Hypodermis monoklonal von S1 abstammt (nicht gezeigt).

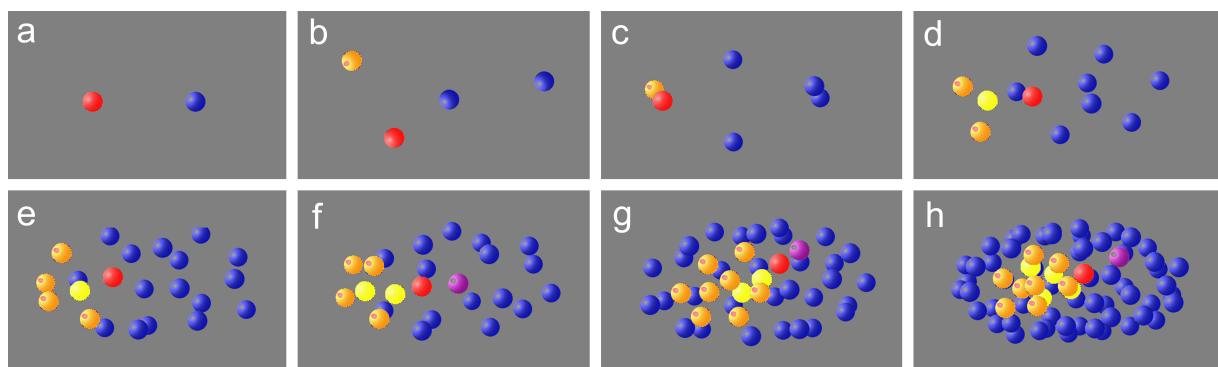


Abb. 47: 3D Modell der frühen Embryogenese von *T. muris*

a) Im 2-Zell Embryo liegt die Keimbahn (rot) anterior von ihrer somatischen Schwester S1 (blau). **b-f)** In einer Reihe longitudinal orientierter Zellteilungen entstehen die Gründerzelle S2 (orange), die Gründer- und Darmvorläuferzelle S3 (gelb) sowie P4 und S4 (violett), die Keimbahn verlagert sich nach posterior. **g-h)** Mit Beginn der Gastrulation wandern Nachkommen von S2 und S3 sowie S4 und P4 ein und Nachkommen von S1 verlagern sich nach anterior. **Orientierung:** anterior links; a-b) linke Lateralansicht; c-h) Ventralansicht.

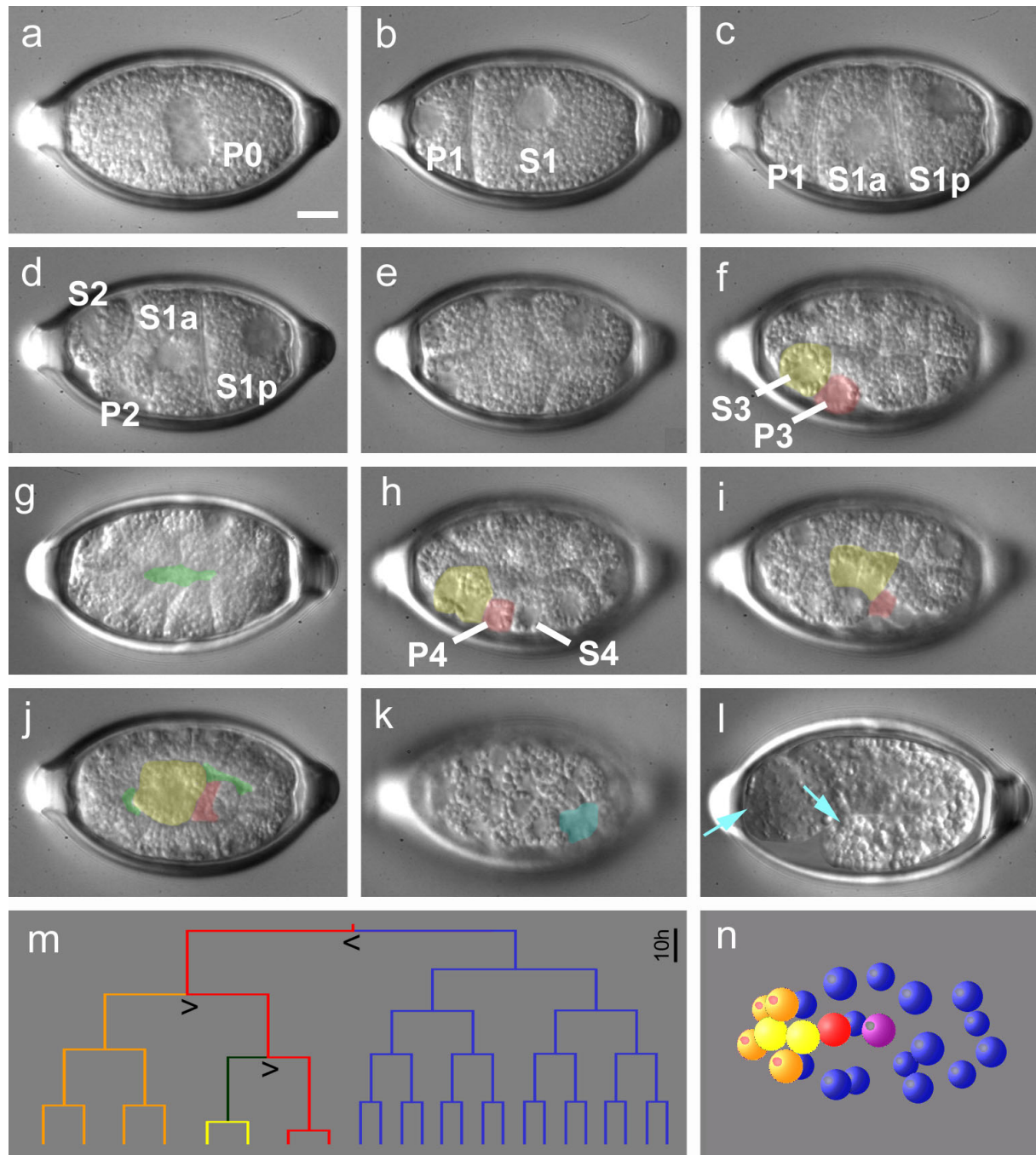


Abb. 48: Embryogenese von *Trichuris muris*

a-e) 1-Zell bis 6-Zell Stadium, P0 und P1 teilen sich asymmetrisch, wobei P1 anterior zum liegen kommt, S1, S1a und S1p teilen sich symmetrisch. **f)** Die Darmvorläuferzelle S3 (gelb) markiert den ventralen Pol. **g-j, n)** Gastrulationsbeginn: Der Embryo bildet eine einlagige Blastula und die Darmvorläuferzellen (gelb) beginnen in ein kleines Blastocoel einzuwandern. P4 teilt sich entlang der anterior-posterioren Körperachse. **k)** Der kleine ovale Blastoporus kommt posterior zum liegen **l)** und Mund und Anus bilden sich durch neue sekundäre Durchbrüche (blaue Pfeile). **m)** Früher Zellstammbaum, in einer Reihe von stammzellähnlichen asymmetrischen (<=>) Zellteilungen entstehen die Gründerzellen S1-S4, P4. **n)** 3D Kugelmodell des in h) dargestellten Embryos zeigt bilaterale Symmetrie. **Farbkodierung:** s. Abb. 6. **Orientierung:** anterior links, a-d, l) linke Lateralansicht, e-k) Ventralansicht. **Eichstrich:** 10µm.

4.4.4 Schlussfolgerungen zu den Untersuchungen an Vertretern der Dorylaimia

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Dorylaimida (Clade 2) embryologisch in mindestens zwei Gruppen unterteilen lassen, wobei die Subgruppen starke Gemeinsamkeiten, aber auch gravierende Unterschiede zueinander aufweisen und in der Folge als Claden 2a und 2b bezeichnet werden.

Die erste Gruppe (Clade 2a) umfasst die Trichinellida und die Beobachtungen an *T. muris* zeigen bereits in der frühen Musterbildung gravierende Unterschiede zu den anderen in dieser Arbeit beschriebenen Dorylaimia auf. So ist die erste Teilung extrem asymmetrisch und durch eine Polaritätsumkehr in P0 kommt die Keimbahn anterior zu liegen. Anders als bei den anderen Dorylaimida stammt der Darm von der Gründerzelle S3 ab und die Gastrulation beginnt mit zwei Darmvorläuferzellen unter Bildung eines kompakten Blastocoels. Zwar zeigen die begonnenen 4D Zellstammbaumanalysen, dass in *T. muris* die Hypodermis ebenfalls monoklonal von einer Gründerzelle abstammt, anders als bei *R. culicivorax* handelt es sich hierbei jedoch um S1 und nicht S2. Die Untersuchungen an *T. muris* zeigen bezüglich der frühen Musterbildung und der Ausbildung eines kompakten Blastocoels starke Ähnlichkeit zu *T. spiralis* (Ewald, 2007).

Die zweite Gruppe (Clade 2b) umfasst die Mermithida, Mononchida und die Dorylaimida und die Beobachtungen zeigen eine große Übereinstimmung in der frühen Musterbildung zwischen *R. culicivorax*, *Dorylaimus sp.* und *Prionchulus sp.* Auch weitere Gemeinsamkeiten wie eine Polaritätsumkehr in P1 und eine relativ zu *C. elegans* umgekehrte Polarität der dorso-ventralen Körperachse sowie eine Serie von asymmetrischen Zellteilungen in Keimbahn und Gründerzelle S1 (aus der auch der Darm hervorgeht) können bei den drei genannten Spezies beobachtet werden. Aber die Ausbildung repetitiver Elemente in der Epidermis wurde nur bei *R. culicivorax* beobachtet, auch deuten die begonnenen 4D Zellstammbaumanalysen von *Prionchulus sp.* darauf hin, dass hier die Zellstammbaumzweige der Gründerzellen weit weniger monoklonal zur Organogenese beitragen.

Die vergleichenden Untersuchungen zeigen, dass *R. culicivorax* nicht repräsentativ für die gesamten Dorylaimia ist, er aber zumindest viele Gemeinsamkeiten mit anderen Mitgliedern des neu definierten Clade 2b teilt und mit seiner Hilfe die Analyse und ein besseres Verständnis von weiteren basalen Vertretern der Nematoda möglich sein sollte.

4.5 Untersuchungen an Vertretern der Enoplia

Die ursprüngliche Beobachtung von *Tobrilus diversipapillatus* (Clade 1) offenbarte eine für die Nematoden absolut ungewöhnliche Gastrulation unter Ausbildung eines großen Blastocoels und der Formation dreier deutlich abgegrenzter Keimblätter, sie zeigte dabei während der ersten Teilungen jedoch weder eine sichtbare Keimbahn-Soma Auftrennung noch asymmetrische Zellteilungen (Schierenberg, 2005).

Um zu überprüfen, ob sich die aus *R. culicivorax* und den anderen Vertretern der Dorylaimia (Claden 2a und 2b; Kapitel 4.4.4) gewonnenen Erkenntnisse auf die Enoplia (Clade 1) übertragen lassen, wurde mit der 4D-Zellstammbaumanalyse von *Tobrilus stefanskii* begonnen.

4.5.1 Untersuchungen an *Tobrilus stefanskii*

Der Embryo von *T. stefanskii* füllt seine umgebende Vitellinmembran und Eischale nicht vollständig aus (Abb. 50a). Anders als bei *R. culicivorax* teilen sich neben P0 auch S1 und P1 symmetrisch (Abb. 50b, c), jedoch verlaufen die weiteren Teilungen der Keimbahn asymmetrisch in einer Reihe entlang der anterior-posterioren Körperachse (Abb. 49 und 50m) und definieren die ventrale Mittellinie des Embryos. Zwar treten ähnlich wie in *R. culicivorax* auch asymmetrische Teilungen innerhalb der somatischen Zellen auf, jedoch ist die Darmvorläuferzelle hier kleiner als ihre Schwesterzelle (Abb. 49e, g und 50m). Im Gegensatz zu *R. culicivorax* sind die Teilungsspindeln in S1 und P1 nicht linear ausgerichtet, sondern sie liegen parallel und die resultierenden Tochterzellen sind symmetrisch (Abb. 50c). Mit der nächsten Teilungsrunde orientieren sich die Teilungsspindeln in S1p und P2 allerdings auf einen gemeinsamen Punkt (n=11; rosa Quadrat, Abb. 49a) hin aus. In der Folge kann beobachtet werden, dass sich angrenzende Zellen in *T. stefanskii* gegenüber diesem Punkt (rosa Quadrat) nicht verschieben und sich die Teilungsspindeln angrenzender Zellen (S1p-S1pppp und P2-P5) zu diesem Punkt hin ausrichten und aus ihrer mittigen Lage auch zu diesem hin verschieben (Abb. 49). Damit zeigt diese Region starke Ähnlichkeit zur RFM in *R. culicivorax*, allerdings mit einer Zellgeneration Verspätung (s. Diskussion).

Interessanterweise teilt sich die Darmvorläuferzelle in *T. stefanskii* gegenüber den anderen Zellen des 8-Zell Stadiums verspätet (Abb. 50m) und zeigt somit eine Ähnlichkeit zu *E. brevis* (Clade 1), bei dem sich die Darmvorläuferzelle als Vertreter des einzigen identifizierbaren Zellstammbaumzweiges ebenfalls im 8-Zell Stadium verspätet, jedoch symmetrisch teilt (Voronov, 1999; Voronov und Panchin, 1998). Die Gastrulation von *T. stefanskii* beginnt anders als bei allen bisher beschriebenen Nematoden mit der Einwanderung einer Gruppe von acht Zellen in eine etwa 100-zellige Blastula mit großem

Blastocoel. Wie bei *R. culicivox* stammt die Darmvorläuferzelle von S1 ab und die Keimbahn folgt dem Darm ins Innere (nicht gezeigt), wobei als Folge ihrer Einwanderung ein ovaler Blastoporus genau auf der ventralen Mittellinie entsteht (Abb. 50h). Durch Zelleinfaltungen beginnt sich der Blastoporus in anteriorer Richtung auszudehnen und eine Blastoporusspalte zu bilden, die sich über knapp 2/3 des Embryos erstreckt (Abb. 50h, j). Zellen von beiden Körperhälften des Embryos beginnen sich über die Mitte der Rinne zu schieben und diese zu überdecken (Abb. 50k). Von der Mitte der Blastoporusspalte aus beginnt sie sich reißverschlussartig zu beiden Polen zu schließen und nur zwei kleine Öffnungen bleiben als primärer Durchbruch erhalten und bilden den späteren Mund und vermutlich auch den Anus (Abb. 50l).

Die frühe Musterbildung ähnelt keinem der in dieser Arbeit beschriebenen Nematoden, auch sind weder eine Ringbildung noch repetitive Elemente, wie sie bei *R. culicivox* auftreten, zu beobachten. In *T. stefanskii* sind die Nachkommen der Gründerzellen S2, S3 und S4 nicht bilateralsymmetrisch rechts und links der Mittellinie angeordnet (Abb. 50n). Vorläufige Zellstammbaumanalysen lassen jedoch den Schluss zu, dass die Zellschicksale im Embryo von *T. stefanskii* bilateralsymmetrisch angeordnet sind. Teile des Zellstammbaums, welche zu Pharynx, Darm und Keimbahn beitragen, formen schon früh sichtbare Primordien und werden möglicherweise schon früher als die anderen Gewebe determiniert. Wie auch bei *Prionchulus* sp. scheint die Hypodermis in *T. stefanskii* nicht monoklonal wie bei *R. culicivox* aus der Gründerzelle S2 hervorzugehen.

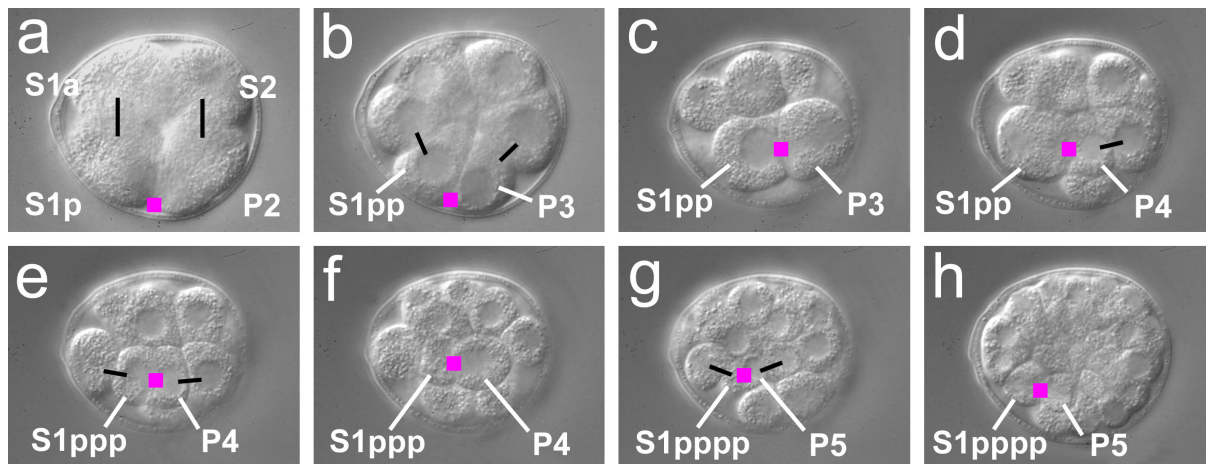


Abb. 49: RFM-artige Zellpolarisierung in *Tobrilus stefanskii*

a, b) Die Teilungen der S1 und P1 resultieren in vier symmetrischen Zellen, wovon sich lediglich die Teilungsspindeln der S1p und P2 auf einen gemeinsamen Punkt (rosa Quadrat) hin ausrichten. **b-h)** Im Folgenden verschieben sich angrenzende Zellen (S1p-S1pppp und P2-P5) nicht gegen diesen Punkt und richten ihre Teilungsspindeln in anterior-posteriorer Orientierung zu diesem Punkt aus. Angrenzende Zellen teilen sich asymmetrisch, wobei die kleinere Tochterzelle jeweils zu diesem Punkt benachbart liegt. Dies wird in dieser Kollage besonders für **b)** P3, **e)** P4, **g)** P5 und **e)** S1ppp, **g)** S1pppp deutlich. **Orientierung:** anterior links, a,b) Lateralansicht, c-h) Ventralansicht.

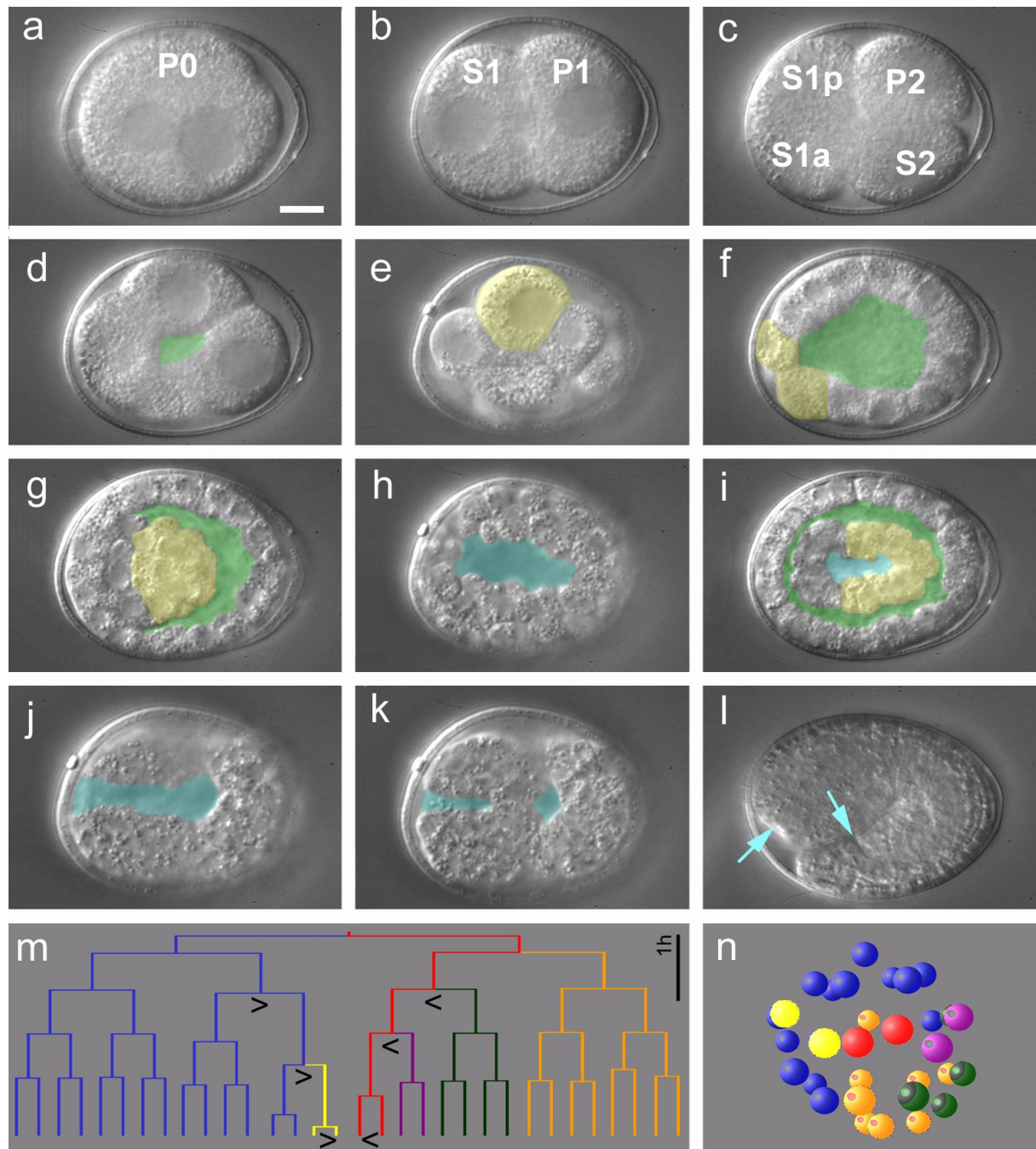


Abb. 50: Embryogenese von *Tobrilus stefanskii*

a-c) 1-Zell bis 4-Zell Stadium, Zellteilungen von P0, P1 und S1 resultieren in symmetrischen Tochterzellen. **e)** Die Darmvorläuferzelle S1ppp (gelb) markiert den ventralen Pol. **f-g, n)** Gastrulationsbeginn: Der Embryo bildet eine einlagige Blastula und die Darmvorläuferzellen (gelb) beginnen in ein großes Blastocoel einzuwandern. P4 teilt sich entlang der anterior-posterioren Körperachse. **h-k)** Durch Zelleinwanderungen streckt sich der Blastoporus schlitzförmig entlang der anterior-posterioren Körperachse über 2/3 des Embryos, beginnt ausgehend von seiner Mitte sich reißverschlussartig zu beiden Polen zu schließen und nur zwei punktförmige Öffnungen bleiben als primäre Durchbrüche erhalten **l)** und scheinen Mund und Anus zu bilden (blaue Pfeile). **m)** Früher Zellstammbaum, in einer Reihe von stammzellähnlichen asymmetrischen (<>) Zellteilungen entstehen die Gründerzellen S1-S4, P4, Polaritätsumkehr tritt in P1 auf. **n)** 3D Kugelmodell des in f) dargestellten Embryos zeigt keine bilaterale Symmetrie. **Farbkodierung:** s. Abb. 6. **Orientierung:** anterior links, a-d, l) linke Lateralansicht, e-k) Ventralansicht. **Eichstrich:** 10µm.

4.5.2 Schlussfolgerungen zu den Untersuchungen an Vertretern der Enoplia

Anders als für *T. diversipapillatus* (Schierenberg, 2005) beschrieben, zeigt *T. stefanskii* asymmetrische Zellteilungen und eine sichtbare Keimbahn mit dem Beginn des 8-Zell Stadiums.

Die Beobachtung, dass Teilungsspindeln (S1p-S1pppp und P2-P5) sich auf einen gemeinsamen Punkt hin ausrichten und asymmetrisch verlagern, aber die Zellen sich relativ zu diesem Punkt nicht verschieben und hierdurch eine Reihe von Zellen entlang der anterior-posterioren Körperachse entsteht, zeigt sehr starke Ähnlichkeit zum Verhalten der an die RFM in *R. culicivorax* angrenzenden Zellen (Kapitel 4.3.7). Dies spricht dafür, dass es sich hierbei zumindest funktionell um eine gleichartige Region in *T. stefanskii* handelt (s. Diskussion).

Die Ausbildung einer anterior-posterioren Körperachse durch eine Serie von asymmetrischen Teilungen der Keimbahn und der Darmvorläuferzelle sowie eine Gastrulation unter Formung einer Blastoporusrinne sind weitere gemeinsame Merkmale, welche *T. stefanskii* (Clade 1) mit *R. culicivorax* (Clade 2b) verbinden.

5. Diskussion

Eine gefasste Hypothese gibt uns Luchsaugen
für alles sie Bestätigende
und macht uns blind
für alles ihr Widersprechende.

A. Schopenhauer

Variationen in der frühen Spindelorientierung und räumlichen Musterbildung

Die verbreitete Vorstellung über die Frühentwicklung des Taxons Nematoda ist geprägt durch *C. elegans* (Clade 9; Sulston et al., 1983) und *A. megalocephala* (Clade 8; Boveri, 1899; Müller, 1903). Dabei ist eine Abweichung vom „Centriolic Principle“ (Costello, 1961) zu beobachten, wonach eine Teilungsspindel um 90° in eine beliebige Richtung gegenüber der Mitosespindel der vorherigen Zellteilung gedreht ist (Abb. 51, X-Typ). Durch die in *C. elegans* synchron erfolgende Teilung von S1 und P1 und eine aktive Drehung der Teilungsspindel in P1 entgegen dem „Centriolic Principle“ kommt es aufgrund der begrenzenden Eischale zur typischen rhombusförmigen Anordnung des 4-Zell Embryo (Abb. 52a-f). Ohne diese Begrenzung ordnet sich das 4-Zell Stadium T-förmigen an (Abb. 51, T-Typ; Hyman, 1989; Laufer et al., 1980).

Die in dieser Arbeit betrachteten und in der Literatur (Dolinski et al., 2001; Ewald, 2007; Malakhov, 1994; Skiba und Schierenberg, 1992; Sulston et al., 1983; Voronov, 1999; Voronov und Panchin, 1998) beschriebenen Nematoden variieren in den frühen Spindelorientierungen des 2-Zell Stadiums und lassen sich formell in drei Gruppen einteilen, die ich hier als X-Typ, I-Typ und T-Typ (Abb. 51) bezeichne. Diese münden entweder in ein rhombusförmiges oder lineares 4-Zell Stadium.

X-Typ: S1 und P1 teilen sich synchron, die Teilungsspindeln beider Zellen ordnen sich gemäß dem „Centriolic Principle“ an und die sich ausbildenden Tochterzellen bilden ein rhombusförmiges 4-Zell Stadium (Abb. 51, X-Typ).

Typischer Vertreter: *T. diversipapillatus* (Clade 1; Schierenberg, 2005).

T-Typ: S1 und P1 teilen sich synchron, die Teilungsspindel in P1 dreht sich aktiv um 90° entgegen dem „Centriolic Principle“ von transverser zu longitudinaler Position und die sich ausbildenden Tochterzellen gehen aufgrund der begrenzenden Eischale nach einer transienten T-förmigen Anordnung der Teilungsspindeln in ein rhombusförmiges 4-Zell Stadium über (Abb. 51, T-Typ).

Typischer Vertreter: *C. elegans* (Clade 9; Sulston et al., 1983).

Variation: Die Keimbahn von *A. nanus* (Clade 11; Wiegner und Schierenberg, 1998) durchläuft eine Reihe von Teilungen, bevor die erste Teilung von somatischen Zellen beginnt. Hierdurch kommt es trotz senkrecht zueinander stehender Spindelorientierung in S1 und P1 zu einer linearen Anordnung im 4-Zell Stadium.

I-Typ: S1 und P1 teilen sich synchron, die Teilungsspindeln beider Zellen drehen sich um 90° entgegen dem „Centriolic Principle“ in longitudinale Position, so dass die Tochterzellen ein lineares 4-Zell Stadium bilden (Abb. 51).

Typischer Vertreter: *D. coronatus* (Clade 9; Ewald, 2007).

Variation: Aufgrund der beengten Platzverhältnisse innerhalb der Eischale kommt es bei *R. culicivora* und *Prionchulus sp.* (Clade 2b) trotz longitudinaler Spindelorientierung in S1 und P1 zu einer rhombusförmigen Anordnung des 4-Zell Stadiums.

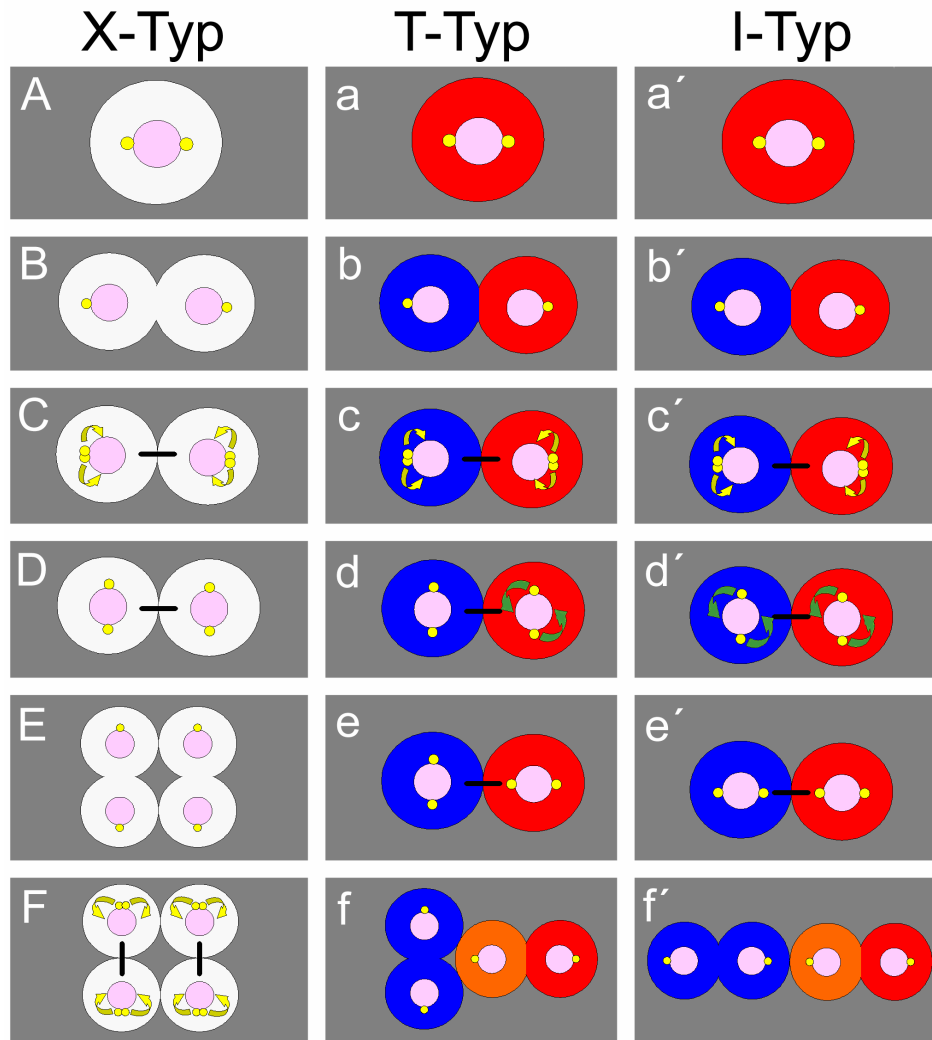


Abb. 51: Schematische Darstellung der Centriolen im X-, T-, und I-Typ

X-Typ) Verdopplung und Anordnung der Centriolen entspricht dem „Centriolic Principle“, wie es in *T. stefanskii* angetroffen wird. **T-Typ)** Verdopplung und Anordnung der Centriolen widerspricht dem „Centriolic Principle“ in S1, wie es in *C. elegans* angetroffen wird. **I-Typ)** Verdopplung und Anordnung der Centriolen widerspricht dem „Centriolic Principle“ in S1 und P1, wie es in *D. coronatus* angetroffen wird. **Gelbe Kreise:** Centriolen, **rosa Kreise:** Zellkerne, **schwarze Balken:** Schwesterzellen, **gelbe Pfeile:** Wanderung der Centriolen, **grüne Pfeile:** Drehung des Spindel/Kern Komplexes, **blaue Kreise:** S1, **orange Kreise:** S2, **rote Kreise:** P0-P2.

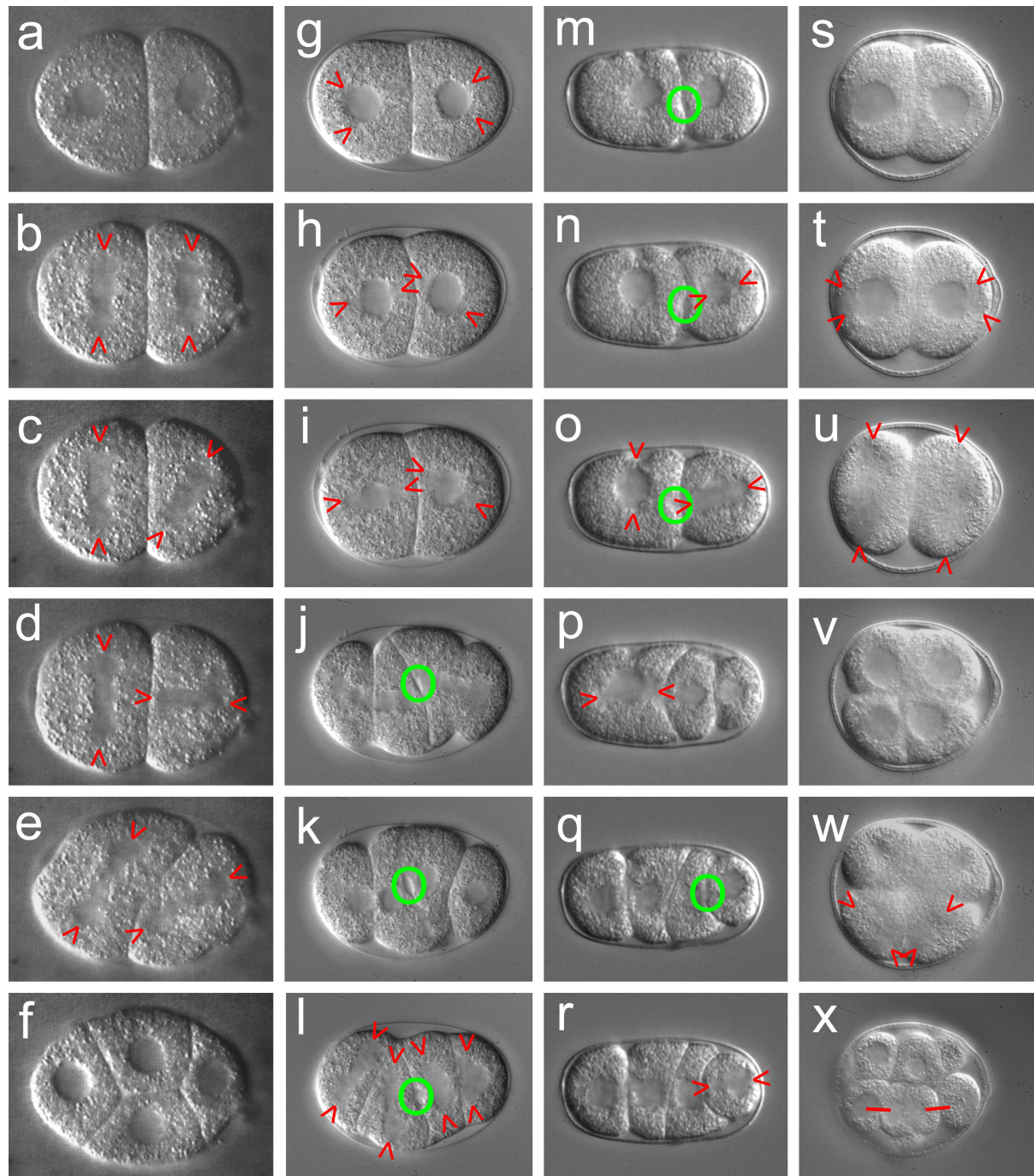


Abb. 52: Spindelrotation, Zellarrangement und „cortical invagination“

a-f) Bilder E. Schierenberg; Eine dem T-Typ entsprechende Anordnung der Teilungsspindeln in *Rhabditis* sp. (ES104) mündet in ein rhombusförmiges 4-Zell Stadium. **g-l)** Eine dem I-Typ entsprechende Anordnung der Teilungsspindeln in der *par-6* Mutante von *C. elegans* mündet in ein lineares 4-Zell Stadium. Zwischen S1 und P1 bildet sich eine „cortical invagination“ (grüner Kreis) aus. **m-r)** Eine dem I-Typ entsprechende Anordnung der Teilungsspindeln in *D. coronatus* mündet in ein lineares 4-Zell Stadium. Zwischen S1 und P1 und S2 und P2 bildet sich eine „cortical invagination“ aus. **s-x)** Eine bis zum 4-Zell Stadium dem X-Typ entsprechende Anordnung der Teilungsspindeln in *T. stefanskii*. **rote Pfeile:** Orientierung der Teilungsspindeln.

Wie werden die unterschiedlichen Orientierungen der Teilungsspindeln gesteuert?

Für *C. elegans* sind zwei Modelle vorgeschlagen worden, welche die Abweichung der Spindelorientierung vom „Centriolic Principle“ in P0 und P1 erklären könnten.

- 1) Zum einen könnten „cortical pulling sites“, welche für P1 im Bereich des Midbodies als Ansatzpunkte für Spindelmikrotubuli vorgeschlagen wurden, für eine Drehung der Teilungsspindel sorgen (Cowan und Hyman, 2004a; Hyman, 1989; Hyman und White, 1987; Keating und White, 1998; Waddle et al., 1994).
- 2) Zum anderen könnte eine lokale Abschaltung einer ansonsten vom gesamten Cortex aus gleichmäßig wirkenden „cortical pulling force“, z.B. durch die lokale Beschränkung eines kortikalen Bandes von LET-99 Proteins um die Längsachse des Embryos in P0 und P1, für eine Drehung der Teilungsspindel sorgen (Cowan und Hyman, 2004a; Tsou et al., 2002; 2003; Wu und Rose, 2007).

Für die Abweichung vom „Centriolic Principle“ in P2, P3, S2 und S2p wurde eine gesonderte Erklärung postuliert.

- 3) Demnach sind MES-1/SRC-1 an den Kontaktflächen zwischen P2 und S2 bzw. P3 und S2p exprimiert (Abb. 3c, d) und wirken dort bidirektional auf die anterior-posteriore Spindelorientierung und das Schicksal der angrenzenden Zellen (Bei et al., 2002; Berkowitz und Strome, 2000).

Im Zusammenhang mit der Klärung eines für die Spindeldrehung verantwortlichen Mechanismus ist die Entwicklung von *Plectus sp.* (ES601; Clade 6; Kapitel 4.2.1) besonders aufschlussreich. Dessen frühe Musterbildung entspricht zwar zumeist dem T-Typ, in wenigen Ausnahmen (2/11) wurde jedoch eine dem I-Typ entsprechende Anordnung der Teilungsspindeln beobachtet, welche aufgrund der Begrenzung der Eischale aber ebenfalls in eine rhombusförmige Anordnung übergeht. Diese Beobachtung legt nahe, dass ein Wechsel zwischen dem T-Typ und dem I-Typ relativ einfach sein muss. Auch die Tatsache, dass nahe Verwandte wie *C. elegans* und *D. coronatus* (beide Clade 9) je einen der Typen repräsentieren, spricht für einen einfachen Wechsel. Wenn dies tatsächlich durch eine einfache Mutation zu erreichen wäre, sollte sich unter den vielen Mutanten von *C. elegans* mit hoher Wahrscheinlichkeit ein entsprechender Phänotyp finden.

Tatsächlich zeigen die *par-3* und *par-6* Mutanten (Abb. 52g-l) die Spindelorientierung des I-Typs (Keating und White, 1998). Besonders interessant ist dabei, dass sowohl bei den oben beschriebenen *par*-Mutanten in *C. elegans* als auch beim Wildtyp von *D. coronatus* eine blasenartige Struktur zwischen den Zellen, die so genannte „cortical invagination“ (Hyman, 1989) zu beobachten ist (grüner Kreis, Abb. 52). Diese Struktur ist im Wildtyp von *C. elegans* lediglich schwach im anterioren Zellkortex der P1 ausgeprägt (Hyman, 1989; Hyman und White, 1987). Eine transiente Kolokalisation mit Actin und Capping Protein zeigt, dass sich diese Struktur bei *C. elegans* in unmittelbarer Nähe des

Midbodies ausgebildet (Waddle et al., 1994) und sich die Teilungsspindel in P1 zu dieser hin ausrichtet (Keating und White, 1998).

Diese Beobachtungen führten zur Hypothese, dass „cortical pulling sites“ im Bereich der „cortical invagination“ als Ansatzpunkte für Spindelmikrotubuli dienen, welche für eine Drehung der Teilungsspindel in P1 sorgen (Cowan und Hyman, 2004a; Hyman, 1989; Hyman und White, 1987; Keating und White, 1998; Waddle et al., 1994).

Ähnlichkeiten zu den in Nematoden postulierten „cortical pulling sites“ können auch in Chordaten gefunden werden. In Embryonen von Ascidien werden asymmetrische Zellteilungen durch eine kortikale Struktur, den sogenannten „centrosome-attracting body“, in der posterior-vegetalen Region induziert (Hibino et al., 1998), welcher mit einem aPKC/PAR-6/PAR-3 Proteinkomplex assoziiert ist (Patalano et al., 2006), wie er auch in *C. elegans* zu finden ist (Hao et al., 2006). Ein Verlust des „centrosome-attracting body“ resultiert in symmetrischen Zellteilungen und die ektopische Verlagerung dieses Organells führt zu einer ektopischen asymmetrischen Zellteilung (Nishikata et al., 1999).

Modell: Möglicherweise stellt bei *C. elegans* die korrekte asymmetrische Verteilung (Abb. 3) und Interaktion des aPKC/PAR-6/PAR-3-Komplexes mit der Midbodyregion einen einfachen Schalter dar, um eine ansonsten permanent aktive „cortical pulling site“ in S1 abzuschalten (und die ansonsten daraus resultierende „cortical invagination“ zu unterdrücken). Zumal sowohl das experimentelle Ausschalten der aPKC (PKC-3; Tabuse et al., 1998) und von PAR-6 (Hung und Kemphues, 1999) mittels RNAi sowie die Mutation in *par-3* (Keating und White, 1998) zu einer dem I-Typ entsprechenden Anordnung der Teilungsspindeln in S1 und P1 von *C. elegans* führt (Abb. 52g-l). Dies würde einer aktiven „cortical pulling site“ in S1 und P1 entsprechen und die gut ausgebildete „cortical invagination“ erklären. Unterstützt wird eine solche Vorstellung dadurch, dass in P1 des Wildtyps zunächst der PAR-1/PAR-2 Komplex und in S1 der aPKC/PAR-6/PAR-3 gleichmäßig verteilt ist (Gönczy und Rose, 2005), was nach der oben skizzierten Vorstellung lediglich ein Abschalten der „cortical pulling site“ in S1 zur Folge hätte. Erst später kommt es auch in P1 zu einer aktiven Drehung der Teilungsspindel um 90°, einer asymmetrischen Verteilung der aPKC/PAR-6/PAR-3 und PAR-1/PAR-2 Komplexe (Abb. 3) und dem zeitgleichen Auftauchen des LET-99 Bandes (Gönczy und Rose, 2005). Dies könnte jedoch bedeuten, dass das LET-99 Band (Tsou et al., 2002; 2003; Wu und Rose, 2007) nur für die Etablierung von asymmetrischen Zellteilungen in P1 nötig ist (siehe weiter unten). Zu der Vorstellung einer permanent aktiven „cortical pulling site“, welche durch die Anwesenheit von aPKC/PAR-6/PAR-3 abgeschaltet wird, passen die Beobachtungen der dem X-Typ entsprechenden Spindelorientierung von S1 und P1 in *par-2* Mutanten von *C. elegans* (Cheng et al., 1995), in welchen aPKC/PAR-6/PAR-3

gleichmäßig über den Zellkortex verteilt sind (Hao et al., 2006), sowie die dem I-Typ entsprechende Spindelorientierung in *par-2/par-3* Doppelmutanten (Cheng et al., 1995).

Nach dieser Modellvorstellung wäre es also möglich, durch eine einzige Mutation, welche ein Abschalten der permanent aktiven „cortical pulling site“ durch aPKC/PAR-6/PAR-3 unterbindet, vom T-Typ zum I-Typ der Spindelorientierung in S1 und P1 umzuschalten und somit vom rhombusförmigen zum linearen 4-Zell Stadium. Das LET-99 Band Modell (Tsou et al., 2002; 2003; Wu und Rose, 2007) bietet hingegen keine hinreichende Erklärung für die Etablierung des I-Typs, wie er z.B. bei *D. coronatus* und in einigen Fällen bei *Plectus sp.* (ES601) beobachtet wurde (Kapitel 4.2.1). Nach diesem Modell müsste jeweils ein LET-99 Band in S1 und P1 vorhanden sein, was bei einer normalen anterior-posterioren Verteilung der PAR-Proteine wie in *C. elegans* nicht möglich ist. Die PAR Expression ist nämlich zumindest für *C. elegans* kritisch, da gezeigt wurde, dass deren asymmetrische Verteilung für die Etablierung der frühen anterior-posterioren Körperachse, von asymmetrischen Zellteilungen und zur Aufrechterhaltung des Keimbahncharakters nötig ist. Um das vorgeschlagene Modell zu überprüfen und somit zu einem besseren Verständnis zu kommen wie in der Stammesgeschichte der Nematoden Zellpolarität etabliert wurde, ist es unerlässlich das Expressionsmuster der PAR-Proteine, von LET-99 und von MES-1/SRC-1 in den beschriebenen Spezies zu untersuchen.

Ist der X-, I- oder der T-Typ der frühen Musterbildung ursprünglich?

Dolinski et al. (2001) haben die frühe Musterbildung von 70 Spezies der Rhabditia (Claden 7-12) verglichen. Sie definieren die synchrone Teilung von S1 und P1 und das rhombusförmige 4-Zell Stadium gegenüber dem linearen 4-Zell Stadium als plesiomorph für die Rhabditia, letzteres müsste sich folglich mehrmals unabhängig voneinander entwickelt haben.

Da sie jedoch keine Aussage über die Orientierungen der Teilungsspindeln (T-Typ oder I-Typ) im 2-Zell Embryo treffen bzw. die Teilung von S1 in einem Drittel der von ihnen beschriebenen Embryonen gegenüber der Keimbahn zeitlich verzögert war und somit unbeobachtet blieb, bleibt diese Aussage von geringem heuristischen Wert für ein tieferes Verständnis, wie und wann während der Phylogenese der Nematoden frühembryonale Polarität etabliert und modifiziert wurde.

Gerade die Erkenntnisse, dass basale Spezies (Clade 1 und 2) wie *R. culicivorax* und *Prionchulus sp.* eine dem I-Typ entsprechende Anordnung der Teilungsspindeln in S1 und P1 besitzen, es aber aufgrund der Platzverhältnisse innerhalb der Eischale trotzdem zu einer rhombusförmigen Anordnung des 4-Zell Stadiums kommt, sowie die Beobachtung von Spezies mit linearen 4-Zell Stadien (Malakov, 1994; Schierenberg unveröffentlicht), deuten eher darauf hin, dass der X-Typ ursprünglich, der I-Typ gegenüber dem T-Typ plesiomorph

ist und dass die zwischen den verschiedenen Spezies unterschiedlich stark oval geformte Eischale einen Einfluss auf die Anordnung des 4-Zell Stadiums ausübt.

Wie kommt es zur Polaritätsumkehr in der Keimbahn und zu asymmetrischen Zellteilungen?

In *C. elegans* ist eine frühe Trennung von Keimbahn und Soma zu erkennen. Die Keimbahn gibt in einer Reihe stammzellartiger, asymmetrischer Teilungen somatische Gründerzellen entlang der anterior-posterioren Körperachse ab (Deppe et al., 1978; Schierenberg, 2004). In einem als Polaritätsumkehr in der Keimbahn beschriebenen Prozess kommen mit der Teilung von P0 und P1 die somatischen Gründerzellen zunächst anterior, mit der Teilung von P2 und P3 jedoch posterior der Keimbahn entlang der anterior-posterioren Achse zu liegen (Abb. 3g; Schierenberg, 1987; Schierenberg et al., 1997/98). Es gibt folglich zwei unterschiedliche Mechanismen, wie Polarität und asymmetrische Zellteilungen entlang der anterior-posterioren Körperachse zustande kommen. Dies soll im Folgenden erörtert werden. Die anterior-posteriore Polarität in den Keimzellen P0 und P1 wird durch die asymmetrische Verteilung der PAR-Proteine nach dem Eintritt des Spermiums und der Interaktion des männlichen Centrosoms mit dem Zellcortex der befruchteten Oocyte etabliert (Abb. 3a, b; Cowan und Hyman, 2004a; 2004b; Goldstein und Hird, 1996; Gönczy und Rose, 2005; Kemphues und Strome, 1997; Wallenfang und Seydoux, 2000). Dabei konnte eine asymmetrisch auf den Spindelapparat wirkende Zugkraft identifiziert werden, welche für die asymmetrischen Zellteilungen von P0 und vermutlich auch von P1 verantwortlich ist (Abb. 3a, b; Gönczy und Rose, 2005; Grill et al., 2001; 2003; Grill und Hyman, 2005; Nguyen-Ngoc et al., 2007; Schierenberg, 1987). Hingegen wird die Polarität in den Keimzellen P2 und P3 durch MES-1/SRC-1 etabliert, welche zwischen P2 und S2 bzw. P3 und S2p lokalisiert sind (Abb. 3c, d) und bidirektional auf das Schicksal und die dem I-Typ entsprechende Orientierung der angrenzenden Teilungsspindeln wirken (Bei et al., 2002; Berkowitz und Strome, 2000). Gleichzeitig kann eine asymmetrisch wirkende Zugkraft auf die Spindelapparate von P2 und P3 hin zum Ort der MES-1/SRC-1 Lokalisation beobachtet werden, was dann zu asymmetrischen Zellteilungen führt (Abb. 3c; Schierenberg, 1987).

Warum gibt es zwei Wege zur Etablierung von Polarität und asymmetrischen Zellteilungen?

Ein korrekter Kontakt der Keimbahnvorläufer und des Darms scheint für die Normalentwicklung vieler Tiere (*C. elegans*, *Drosophila*, *Xenopus*, Maus) essentiell zu sein (Sulston et al., 1983; Wylie, 1999). Durch den invarianten Zellstammbaum und die Polaritätsumkehr von *C. elegans* kommen und bleiben Darmvorläuferzellen und Keimbahn in Kontakt (Schierenberg, 1987; Sulston et al., 1983). Dabei ist eine Induktion im frühen 4-Zell

Stadium zwischen S2 und P2 für die Determinierung des Darmschicksals in S2p nötig (Goldstein, 1992; Schierenberg, 1987) und MES-1/SRC-1 könnte für die Etablierung und Aufrechterhaltung dieses Kontaktes zwischen Darm und Keimbahn essentiell sein (Berkowitz und Strome, 2000).

Nach meiner Vorstellung dient die Polaritätsumkehr in der Keimbahn von *C. elegans* jedoch nur sekundär der Etablierung und Aufrechterhaltung eines solchen Kontaktes, da einige Vertreter der Rhabditia keine Polaritätsumkehr der Keimbahn aufweisen (s. Ergebnisteil, *A. nanus* und *D. coronatus*; Dolinski et al., 2001; Skiba und Schierenberg, 1992). Bei diesen Vertretern kommen die somatischen Gründerzellen anterior von P0-P4 entlang der anterior-posterioren Körperachse zum liegen (Skiba und Schierenberg, 1992) und ein Kontakt zwischen Darm und Keimbahn wird erst durch kompensierende Zellwanderung hergestellt, wobei P4 im Vorfeld der Gastrulation zur Darmvorläuferzelle gelangt (Ergebnisteil; Ewald, 2007; Skiba und Schierenberg, 1992). Vielmehr ist die Polaritätsumkehr bei *C. elegans* wohl eher ein Ausdruck der Aufrechterhaltung der anterior-posterioren Polarität im Embryo, denn mit dem Übergang vom 2-Zell zum 4-Zell Stadium geht ein Wechsel der anterior-posterioren Verteilung der PAR-Proteine einher, hin zu einer apikobasalen Verteilung (Abb. 3a,b,e; Nance et al., 2003; Nance und Priess, 2004; Reese et al., 2000). Diese ist für eine asymmetrische Zelladhäsion nötig, welche zur Bildung eines rudimentären Blastocoels führt (Abb. 3f) und essentiell für die späteren Gastrulationsereignisse ist (Nance und Priess, 2004). Jedoch geht die apikobasale Verteilung der PAR-Proteine zwangsläufig mit einem Funktionsverlust als bisherige Determinante der anterior-posterioren Körperachse des Embryos einher. Deshalb kann sich P2 nicht weiter wie P0 und P1 nach demselben Mechanismus asymmetrisch entlang der anterior-posterioren Körperachse teilen. Folglich scheint die ab dem 4-Zell Stadium beginnende Expression von MES-1/SRC-1 zur Aufrechterhaltung der anterior-posterioren Körperachse essentiell zu sein und ersetzt die PAR-Proteine als System zur anterior-posterioren Polarisierung.

Organisiert die RFM die Polaritätsumkehr in der Keimbahn bei basalen Nematoden?

In *R. culicivora* konnte ein netzenartiger Verbindungspunkt zwischen Keimbahn und Darmvorläuferzelle beobachtet werden, die „region of the first midbody“ (RFM). Angrenzende Teilungsspindeln richten sich dem I-Typ entsprechend zur RFM aus und verschieben sich in der Keimbahn zusätzlich asymmetrisch zur RFM hin. Die RFM ist jedoch weit mehr als ein einfacher Verankerungspunkt. Experimentell konnte gezeigt werden, dass in *R. culicivora* anders als bei *C. elegans* (Goldstein, 1992; Schierenberg, 1987) vermutlich keine Induktion des Darmschicksals von der Keimbahn ausgeht (Kapitel 4.3.13), sondern das Darmschicksal nach Ablation der RFM verloren geht (Kapitel 4.3.14). Darüber hinaus führt eine Ablation der

RFM zum Verlust asymmetrischer Zellteilungen und zum Verlust der dem I-Typ entsprechenden Ausrichtung der Teilungsspindeln (Abb. 33).

Somit verhalten sich S1 und P1 in *R. culicivora* sehr ähnlich wie S2 und P2 in *C. elegans*, wo MES-1/SRC-1 bidirektional auf das Schicksal und die dem I-Typ entsprechende Orientierung der Teilungsspindeln wirken (Bei et al., 2002; Berkowitz und Strome, 2000) und die Teilungsspindel in P2 asymmetrisch hin zur MES-1/SRC-1 Lokalisation verlagert wird (Schierenberg, 1987). Dies ist ein Verhalten, welches auf eine vergleichbare Funktion von RFM in *R. culicivora* und dem MES-1/SRC-1 System in *C. elegans* hindeutet.

Die Beobachtungen an *T. stefanskii* (Clade 1) zeigen im 2-Zell Stadium eine dem X-Typ entsprechende Spindelorientierung in S1 und P1. Ab dem 4-Zell Stadium erinnert jedoch eine Region zwischen der jeweiligen Keimbahn- und Darmvorläuferzelle (Abb. 49), zu der sich die angrenzenden Teilungsspindeln dem I-Typ entsprechend ausrichten und asymmetrisch verlagern, an die RFM bei *R. culicivora*. Die in *T. stefanskii* gegenüber *R. culicivora* eine Zellgeneration später entstehende polare Ausrichtung der Spindeln könnte als heterochrone Verschiebung eines "RFM-artigen" Mechanismus interpretiert werden. Auch bei *Prionchulus* sp. (Clade 2b; Kapitel 4.4.1) und *Dorylaimus* sp. (Clade 2b; Kapitel 4.4.2) kann eine solche an die RFM von *R. culicivora* erinnernde Region zwischen Keimbahn- und Darmvorläuferzelle, zu der sich die angrenzenden Teilungsspindeln dem I-Typ entsprechend ausrichten und asymmetrisch verlagern, beobachtet werden. Bei basalen Nematoden könnte also generell ein Polarisierungsmechanismus existieren, der dem bei *R. culicivora* beobachteten entspricht und zumindest funktionell dem MES-1/SRC-1 Mechanismus bei *C. elegans* gleichkommt.

Ist die sichtbare Trennung von Keimbahn und Soma im 2-Zell Stadium ein abgeleitetes Merkmal?

Als eines der herausragenden Merkmale der Frühentwicklung der Nematoden gilt die frühe sichtbare Trennung von Keimbahn und Soma, wobei durch asymmetrische stammzellartige Zellteilungen aus einer Keimbahnzelle in der Regel eine sichtbar größere somatische und eine kleinere Keimbahnzelle hervorgehen. Die Enoplea (Claden 1-2) zeigen hingegen meistens keine frühen asymmetrischen Zellteilungen. Letztere treten wenn überhaupt erst mit dem 4-Zell oder 8-Zell Stadium auf (s. Ergebnisteil; Malakhov, 1994; Schierenberg, 2005; Voronov, 1999; Voronov und Panchin, 1998).

Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass zumindest viele Vertreter der Enoplea (Claden 1-2) im Gegensatz zu *C. elegans* keine asymmetrische Verteilung der PAR-Proteine in Kombination mit einer asymmetrischen Zugkraft am posterioren Pol des Embryos besitzen. Vielmehr scheinen sie nur über eine RFM-ähnliche Region zu verfügen, welche für eine sichtbare Trennung von Keimbahn und Soma ab dem 2-Zell Stadium von *R. culicivora* und

dem 4-Zell Stadium von *T. stefanskii* verantwortlich ist. Dieser Annahme folgend hätte sich erst sekundär bei einem Vorfahren von *C. elegans* eine neue asymmetrische Zugkraft in Kombination mit den PAR-Proteinen am posterioren Pol von P0 und P1 (Gönczy und Rose, 2005; Grill et al., 2001; 2003; Grill und Hyman, 2005; Nguyen-Ngoc et al., 2007; Schierenberg, 1987) ausgebildet, die für ein asymmetrisches 2-Zell Stadium und somit für eine frühe Trennung von Keimbahn und Soma sorgt.

Ist die Polaritätsumkehr in der Keimbahn ein ursprüngliches Merkmal?

Skiba und Schierenberg (1992) haben die Abwesenheit einer Polaritätsumkehr in der Keimbahn, wie sie unter anderem bei *A. nanus* und *D. coronatus* gefunden wird, als ursprünglich angesehen. Bei diesen Spezies entstehen die somatischen Gründerzellen hintereinander gereiht, anterior der Keimbahn, entlang der anterior-posterioren Achse (s. Ergebnisteil; Ewald, 2007; Skiba und Schierenberg, 1992). Hingegen spricht der Befund in dieser Arbeit, dass eine Polaritätsumkehr in der Keimbahn bei vielen Claden des Taxons Nematoda und bereits bei basalen Vertretern wie *T. stefanskii* und *R. culicivora* existiert, sehr stark für ein ursprüngliches Merkmal. Berkowitz et al. (2000) vermuten, dass in Spezies ohne eine Polaritätsumkehr in der Keimbahn MES-1/SRC-1 nicht mehr in der gleichen Weise wie bei *C. elegans* agieren können und möglicherweise verloren gegangen sind. Jedoch bleibt die Frage offen, wie diese Spezies ihre Polarität und asymmetrischen Zellteilungen dann entlang der anterior-posterioren Körperachse regulieren.

Theoretisch könnten die PAR-Proteine einen Wegfall von MES-1/SRC-1 kompensieren, indem sie lediglich zeitlich länger als Determinante der anterior-posterioren Körperachse des Embryos wirken, so dass jetzt die Keimbahnzellen P0-P3 einen gemeinsamen Mechanismus zur Etablierung von Polarität und von asymmetrischen Zellteilungen nutzen.

Jedoch stehen die PAR-Proteine nach dieser Vorstellung nicht mehr für eine zeitlich frühe apikobasale Verteilung zur Verfügung, welche essentiell für die Gastrulationsereignisse bei *C. elegans* ist (Abb. 3; Nance und Priess, 2004). Da die Keimbahn in *A. nanus* und *D. coronatus* gegenüber den somatischen Zellen einen wesentlich kürzeren Zellzyklus aufweist (s. Ergebnisteil; Laugsch und Schierenberg, 2004), könnten die PAR-Proteine bis zur Geburt von P4 die Polarität entlang der anterior-posterioren Achse aufrechterhalten, um erst anschließend wie bei *C. elegans* in den somatischen Zellen die essentielle apikobasale Zellpolarität zu definieren.

Um diese Hypothese zu überprüfen, muss die Verteilung der PAR-Proteine und von MES-1/SRC-1 mit Antikörperfärbungen nachgewiesen werden. Die hierfür nötige Isolation der „full-length“ Klone aus *A. nanus* und *D. coronatus* ist bereits auf den Weg gebracht (M. Kroiher, unveröffentlicht).

Können S1 Abkömmlinge auch ohne Induktion durch die Keimbahn unterschiedlich von einander werden?

Bei *C. elegans* sind frühe Induktionen durch Zell-Zell Kontakte im rhombusförmigen 4-Zell Stadium ausgehend von P2 für die Determinierung des Darmschicksals (E) in S2p (Berkowitz und Strome, 2000; Goldstein, 1992; Schierenberg, 1987) und des ABp Schicksals in S1p (Bowerman et al., 1992; Priess und Thomson, 1987) verantwortlich. Unterbleiben diese Induktionen, verhalten sich S1p und S2p wie ihre anterioren Schwesterzellen (ABa und MS; Schnabel und Priess, 1997).

Bei *D. coronatus*, einer Spezies ohne Polaritätsumkehr in der Keimbahn und mit linear angeordnetem 4-Zell Stadium, kommt es anders als bei *C. elegans* niemals zu einem Zell-Zell Kontakt zwischen S1p und P2. Auch zeitlich später auftretende Keimbahnzellen (P3 und P4) haben nur in etwa der Hälfte der beobachteten Fälle Kontakt zu S1p (Kapitel 4.1.1, 4.1.2; Ewald, 2007; Wiegner, 1998). Eine notwendige Induktion durch die Keimbahn, auch zu einem späteren Zeitpunkt als bei *C. elegans*, kann folglich ausgeschlossen werden. Jedoch findet eine Wanderung der Keimbahnzelle P4 zur Darmvorläuferzelle statt, so dass zumindest eine Darminduktion ähnlich wie bei *C. elegans* stattfinden könnte.

Trotzdem konnte für *D. coronatus* gezeigt werden, dass sich S1a und S1p in Bezug auf die Zellzykluslänge, auftretende Zelltode und räumliche Musterbildung unterschiedlich zueinander und sehr ähnlich zu *C. elegans* verhalten, so dass berechtigterweise von den unterschiedlichen Schicksalen ABa und ABp gesprochen werden kann (Kapitel 4.1.1).

Wie könnte aber eine abwesende Zell-Zell Interaktion der Keimbahn kompensiert werden, damit sich S1a und S1p trotzdem zu ABa und ABp differenzieren? Für *C. elegans* wurde ein induktiver Signalaustausch zwischen zwei Zellen über eine dritte Zelle als Relaisstation postuliert (Schnabel, 1995). Alternativ wurde für *A. nanus* eine Serie lateraler Inhibitionen zwischen direkten Nachbarzellen zur Zellspezifizierung vorgeschlagen (Wiegner und Schierenberg, 1998; 1999). Die Differenzierung der S1 Töchter zu ABa und ABp könnte in Spezies ohne Polaritätsumkehr jedoch durchaus autonom erfolgen, zumal sich S1 und P1 dem I-Typ entsprechend teilen und die Spindeldrehung in S1 von transverser zu longitudinaler Orientierung auch nach Entfernung der P1 (Ewald, 2007) stattfindet.

Wie finden Keimbahnzellen ihren Weg ohne Polaritätsumkehr?

Der Kontakt von Keimbahn und Darm scheint für die Normalentwicklung vieler Tiere essentiell zu sein (Sulston et al., 1983; Wylie, 1999). In den meisten hier beschriebenen Vertretern der Nematoden wird ein solcher Kontakt durch die auftretende Polaritätsumkehr automatisch hergestellt. Aber bei *D. coronatus* und *A. nanus*, beides Spezies ohne Polaritätsumkehr, findet stattdessen eine kompensatorische Wanderung der P4 hin zur

Darmvorläuferzelle statt (Kapitel 4.1.1 und 4.1.2; Ewald, 2007; Skiba und Schierenberg, 1992).

Drei Modelle liefern Erklärungen, wie ein solcher Kontakt zwischen Keimbahn und Darmvorläuferzelle sekundär hergestellt werden könnte.

Zum einen wurde für *C. elegans* ein „cell focusing“ Mechanismus vorgeschlagen, der eine Zellsortierung entsprechend dem Zellschicksal vornimmt (Bischoff und Schnabel, 2006; Schnabel et al., 2006). Zum anderen wurde für *D. melanogaster* postuliert, dass eine asymmetrische Dephosphorylierung von Phospholipiden einen Gradienten ausbildet, an welchem sich die Keimzellen orientieren (Renault und Lehmann, 2006; Renault et al., 2004; Sano et al., 2005). Vorstellbar ist aber auch ein „Trial and Error“ Mechanismus, wonach Zellen unspezifisch mit Filopodien ihre Kontaktpartner suchen, wie die primären Mesenchymzellen beim Seeigelembryo (Wolpert et al., 1999; Wray, 1997).

Ein „cell focusing“ Mechanismus könnte mit Hilfe von polysulfierten Hydrocarbonsäuren untersucht werden, welche die Zell-Zell Kommunikation unterbinden (Bossinger und Schierenberg 1996).

Folgen alle Nematoden trotz früher Variationen einem gemeinsamen Muster zur Etablierung von Körperachsen?

Um die Körperachsen während der Embryonalentwicklung von *C. elegans* zu definieren, wird allgemein das "Kartesische System" benutzt. Hierbei handelt es sich um ein dreidimensionales Koordinatensystem mit Nullpunkt im Zentrum des Eies und Ausrichtung der anterior-posterioren Achse entlang der Längsachse des Eies. Dies bringt jedoch zwei Probleme mit sich. Zum einen muss, aufgrund der unveränderlichen Form der Eischale, zwischen der Achsenbezeichnung der Eischale und der des eigentlichen Embryos unterschieden werden, denn der Embryo verändert stetig seine Form und Zellanordnung innerhalb der Eischale. Somit sind die gewählten Achsen zunächst nur willkürliche Hilfskonstrukte, welche nichts über die wirklichen Körperachsen des Embryos aussagen.

Tatsächlich ist die Spezifikation der dorso-ventralen Körperachse von *C. elegans* im Gegensatz zu anderen Systemen wie *D. melanogaster* (Moussian und Roth, 2005) ganz offenbar unabhängig von dorso-ventralen Signalen (Schierenberg und Strome, 1993). Auch viele wichtige Entscheidungen entlang der anterior-posterioren Körperachse werden anders als bei *D. melanogaster* (Wolpert et al., 1999) nicht durch Morphogengradienten determiniert. Generell scheinen diffusionsfähige Morphogene in der Entwicklung von *C. elegans*, bis auf wenige Ausnahmen, wie ein zur „distal tip cell“ distanzabhängiger Wechsel von der Mitose zur Meiose in der Gonade des adulten Tieres (Kimble und Crittenden, 2005), keine Rolle zu spielen. Dies ist aber auch nicht weiter verwunderlich, bedenkt man die geringe Größe des

Embryos, die geringe Zellzahl bei gleichzeitiger somatischer Zellkonstanz und den invarianten Zellstammbaum.

Nichtsdestotrotz erfordert der bilaterale Körperbau der Nematoden z.B. für die korrekte Bildung des zentralen Nervensystems die Etablierung einer ventralen Mittellinie. *C. elegans* scheint dieses Problem auf den ersten Blick durch seinen invarianten Zellstammbaum und der sich daraus ergebenden räumlichen Anordnung von Zellen zu lösen (Hobert und Bulow, 2003; Sulston et al., 1983). Jedoch gibt es auch Vertreter der Nematoden ohne einen invarianten Zellstammbaum (s. Ergebnisteil; Voronov, 1999; Voronov und Panchin, 1998) und es bleibt zu erörtern, wie Nematoden generell ihre Körperachsen und die bilaterale Symmetrie etablieren.

Tatsächlich gibt es verschiedene Strategien, wie in bilateralsymmetrischen vielzelligen Organismen eine Reihe von Zellen die ventrale Mittellinie formt. Für das Problem, wie im Tierreich ein Streifen und somit Achsen gebildet werden, wurden unterschiedliche Lösungswege modelliert (Meinhardt, 2004). Demgegenüber erscheint der hier vorgestellte Lösungsweg für Nematoden jedoch geradezu simpel.

Trotz aller beobachteten frühen Variationen im Taxon Nematoda kann ein gemeinsames Konzept zur Etablierung einer Zellreihe und der Körperachsen identifiziert werden:

Durch die stetige, dem I-Typ entsprechende Spindolorientierung entgegen dem „Centriolic Principle“ von aneinandergrenzenden, sich nicht gegeneinander verschiebenden Zellen (Mechanismen hierfür sind weiter oben erörtert) entsteht in allen von mir untersuchten Spezies eine Aneinanderreihung von somatischen Gründerzellen und der Keimbahn entlang der anterior-posterioren Körperachse und der zukünftigen ventralen Mittellinie (Abb. 53).

Folglich haben die Nematoden einen sehr einfachen Mechanismus entwickelt, ihre anterior-posteriore Körperachse durch eine Zellreihe an der ventralen Seite des Embryos zu determinieren. Ein solcher Mechanismus kann jedoch nur bei Organismen mit geringen Zellzahlen funktionieren und wird umso erfolgreicher umgesetzt, je früher er in der Embryonalentwicklung einsetzt, also möglichst bereits mit dem 2-Zell Stadium.

Die Etablierung der rechts-links Körperachse im Embryo und somit der bilateralen Symmetrie ist ausgehend von einer solchen Zellreihe entlang der anterior-posterioren Körperachse sehr einfach umzusetzen, nämlich durch die rechts-links Teilung einzelner Zellen und ihrer Nachkommen (Abb. 53), nachdem sie ihre Polarisierung verloren haben und damit wieder dem „Centriolic Principle“ folgen.

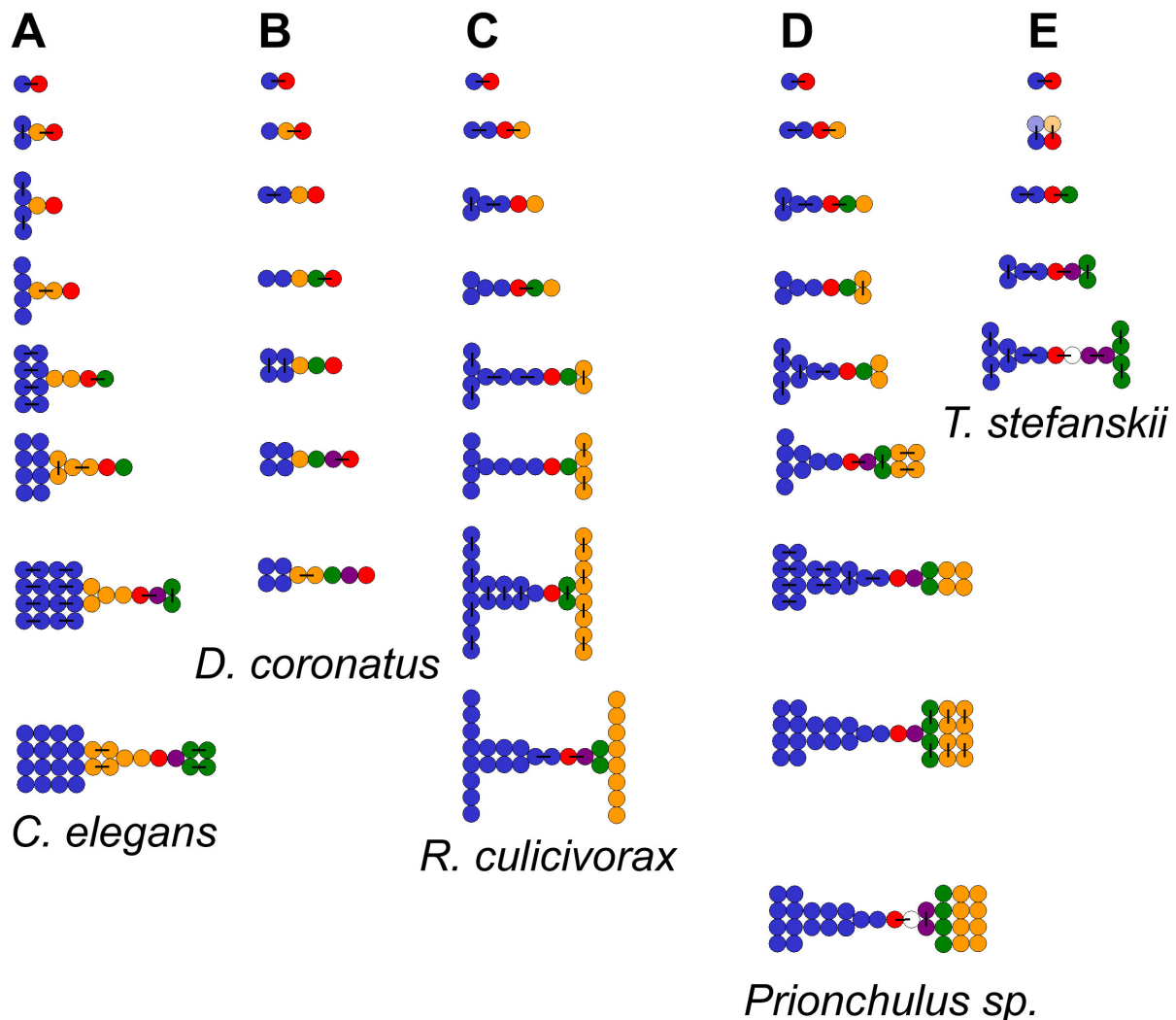


Abb. 53: Entstehung der ventralen Mittellinie bei verschiedenen Nematoden

Diese vereinfachte 2D-Darstellung ohne Eischale ist aus der vorherrschenden Teilungsorientierung von mindestens drei 4D-Aufnahmen rekonstruiert. Asymmetrische Zellteilungen, Zellvolumenabnahme und begrenzende Wirkung der Eischale sind nicht dargestellt. Um eine 2D-Projektion zu ermöglichen, sind Teilungen entlang der dorso-ventralen und rechts-links Körperachse zusammengefasst. **A) C. elegans, B) D. coronatus, C) R. culicivovax, D) Prionchulus sp., E) T. stefanskii.** **Orientierung:** anterior links, Ventralansicht. Die Nachkommen der somatischen Gründerzellen sind wie folgt eingefärbt: **blau:** S1, **orange:** S2, **grün:** S3, **lila:** S4, **weiß:** S5, **rot:** Keimbahn P1-P5.

Als viel komplexer stellt sich hingegen die Etablierung der dorso-ventralen Körperachse heraus. In *C. elegans* gibt es keinen Morphogengradienten entlang dieser Körperachse, S1p bekommt ihr „dorsales“ Schicksal (ABp) genau wie S2p ihr „ventrales“ Schicksal (E) durch Induktionen, welche von posterior liegenden Keimbahnzellen ausgehen (s. Einleitung). Nach Entfernung der begrenzenden Eischale kommt es zu einer linearen Anordnung der P1 Nachkommen entlang der anterior-posterioren Körperachse (Laufer et al., 1980; Schierenberg, 1987). Hier unterbleibt trotz korrekter Induktion des „ventralen“ Schicksals (E) in S2p (entlang der anterior-posterioren Körperachse) die Etablierung einer dorso-ventralen Körperachse. Die mechanische Begrenzung durch die Eischale scheint folglich eine

entscheidende Rolle zu spielen, die Zellen des 4-Zell Stadiums und somit die anterior-posteriore Körperachse so „zu krümmen“, dass sich die Zellen rhombusförmig anordnen und so neben der anterior-posterioren auch eine dorso-ventrale Körperachse ausbilden. Sie werden jedoch weiterhin durch Induktionen nur entlang der anterior-posterioren Körperachse spezifiziert. Es gibt somit keine Hinweise dafür, dass Nematoden überhaupt eine echte dorso-ventrale Körperachse besitzen. Diese Vorstellung passt zu den Vorstellungen von Schierenberg und Strome (1993), wonach es keinen Hinweis auf eine Polarisierung des Embryos entlang der dorso-ventralen oder links-rechts Körperachse gibt.

Interessant sind in diesem Zusammenhang Beobachtungen an *D. coronatus*, wo sich ausgehend von einem linearen 5-Zell Stadium S1p und S2 dorsal bzw. ventral gegeneinander verschieben und somit eine dorso-ventrale Achse ausbilden (Ewald, 2007). Folglich bedienen sich Spezies mit einer linearen Zellanordnung eines Mechanismus unabhängig von der begrenzenden Wirkung der Eischale, um von einer anterior-posterioren Körperachse ausgehend eine dorso-ventrale Achse auszubilden.

Warum gibt es so viele Variationen in der frühen Musterbildung?

Im Taxon Nematoda kann eine äußerst variable embryonale Frühentwicklung beobachtet werden, welche in den verschiedenen betrachteten Spezies während der Morphogenese in ein ähnliches Muster münden (s. Ergebnisteil; Schierenberg, 2001). Es stellt sich somit die Frage, warum es so viele offenbar gleichermaßen erfolgreiche Variationen in der frühen embryonalen Musterbildung bei Nematoden gibt.

Raff (1996) ist der Auffassung, dass gerade zu Beginn der Embryonalentwicklung nur wenige modulare Prozesse exakt ineinander greifen müssen und somit eine hohe Plastizität möglich ist, während in der Morphogenesephase eine exakte räumliche und zeitliche Kongruenz der ablaufenden Prozesse für eine Normalentwicklung nötig ist. Die in den verschiedenen Spezies beobachteten linearen oder rhombusförmigen 4-Zell Stadien und Variationen der frühen Musterbildung können als Ausdruck solcher frühembryonalen Plastizität angesehen werden.

Gould (2002) schlug vor, dass Merkwürdigkeiten oder Mängel, welche im aktuellen embryonalen Kontext keinen Sinn ergeben, Überbleibsel früherer, andersartiger Bedingungen darstellen. Analog zu bestimmten Buchstaben in einem Wort, welche nicht mehr ausgesprochen werden und dennoch vorhanden sind (in der englischen Sprache offensichtlicher als in der deutschen). Folglich könnten die verschiedenen embryonalen Muster auch als eine Momentaufnahme gerade stattfindender Evolution angesehen werden. Möglicherweise sind sie ein Ausdruck verschiedener Optimierungsstrategien, in Anpassung an spezifische Umweltbedingungen (Schierenberg, 2001).

Können musterbildende Prozesse der frühen Embryogenese als phylogenetische Marker dienen?

Die in dieser Arbeit beschriebene Variabilität und Vielfalt der Embryonalentwicklung des Taxons Nematoda zeigen, dass *C. elegans* die Nematoden nicht repräsentativ vertritt. Darüber hinaus erlaubt die Erkenntnis, dass zumindest für die frühe Embryogenese so etwas wie die Biogenetische Grundregel nicht zutrifft, den Ansatz, zu prüfen, in wieweit embryonale Merkmale als phylogenetische Marker verwendet werden können. Hierfür können z.B. die Gastrulation unter Beteiligung eines Blastocoels, asymmetrische Zellteilungen, RFM, Spindelorientierungen und Musterbildung herangezogen werden. Aber nur weil *R. culicivora* (Clade 2b) und *T. stefanskii* (Clade 1) aufgrund molekularer Daten (Holterman et al., 2006; Meldal et al., 2007) viel näher an der Basis des phylogenetischen Stammbaumes der Nematoden stehen, muss dies nicht automatisch bedeuten, dass ihre frühe Musterbildung gegenüber *C. elegans* (Clade 9) ursprünglich ist, zumal zum letzten gemeinsamen Vorfahren hunderte von Millionen Jahren Evolution liegen. Jedoch unterstützen Außengruppenvergleiche mit Nematomorpha (Malakhov und Spiridonov, 1984) und Tardigrada (Gabriel et al., 2007; Hejnol und Schnabel, 2005) eine solche Korrelation, da sie große Ähnlichkeiten in den ersten Zellteilungen zu *R. culicivora* und noch stärkere zu *T. stefanskii* aufweisen und auch noch weitere Gemeinsamkeiten teilen. Meine Ergebnisse erlauben die Annahme, dass embryonale Charaktere tatsächlich potente Marker für phylogenetische Analysen und somit Nematoden exzellente Objekte für vergleichende embryonale Studien sind. Darüber hinaus eröffnet sich die Möglichkeit, die gewonnenen Erkenntnisse des Taxons Nematoda mit den beschriebenen Befunden von Lophotrochozoa und Ecdysozoa zu vergleichen und dadurch erstmalig eine embryologische Unterstützung der Ecdysozoa-Hypothese zu liefern.

Können embryonale Marker zur Unterstützung der Ecdysozoa-Hypothese herangezogen werden?

Nach der Ecdysozoa-Hypothese sind die Nematoden ein Nachbartaxon der Arthropoden (Abb. 7B; Aguinaldo et al., 1997). Erstere haben vermutlich sekundär ihren ursprünglich segmentierten Körperbau verloren (Nielsen, 2003). Dieser Argumentation folgend, könnte es lohnend sein nach Überresten einer Segmentierung in basalen Vertretern der Nematoda zu suchen. Allerdings zeigen Nematoden ganz allgemein stark abgewandelte Charakteristika, die wohl mit der geringen Zellzahl und Körpergröße zusammenhängen. In *C. elegans* und *P. marina* kann lediglich die Ausbildung von repetitiven Elementen des Zellstammbaums beobachtet werden (Houthoofd et al., 2003; Sulston et al., 1983), welche zur Darm- und Teilen der Hypodermisentwicklung beitragen. Jedoch kommt in *R. culicivora* (Clade 2b) das Muster der neuronalen- und Hypodermisentwicklung mit der Bildung und anschließenden

Duplikation von Zellringen entlang der anterior-posterioren Körperachse (Abb. 42) einer Segmentierung deutlich näher als alles, was bisher in Nematoden beobachtet und beschrieben wurde.

Durch einen Vergleich des Entwicklungsmusters von basalen Nematoden mit dem in der Literatur beschriebenen Muster bei Rotatorien (Lechner, 1966), welche nach der Articulata-Hypothese (Abb. 7A) nah und nach der Ecdysozoa-Hypothese (Abb. 7B) nur entfernt mit den Nematoden verwandt sind, werden keine gemeinsamen Muster offensichtlich. Dagegen ist die Ähnlichkeit zwischen *T. stefanskii* (Clade 1) und dem Tardigraden *H. dujardini* (Gabriel et al., 2007) in Bezug auf das frühe Zellteilungsmuster und die Bildung der anterior-posterioren Körperachse geradezu frappierend (vergl. Abb. 49 mit 54). Die Bildung der anterior-posterioren Körperachse in *H. dujardini* entspricht genau dem von mir beschriebenen Muster in Nematoden. Dort entsteht durch eine stetig dem I-Typ entsprechende Spindelorientierung in aneinander grenzenden sich nicht gegeneinander verschiebenden Zellen eine Reihe von Gründerzellen entlang der anterior-posterioren Körperachse und der zukünftigen ventralen Mittellinie (Abb. 53). Offenbar teilen Tardigraden und basale Nematoden wesentliche frühe musterbildende Prozesse und unterstützen dadurch die Ecdysozoa Hypothese.

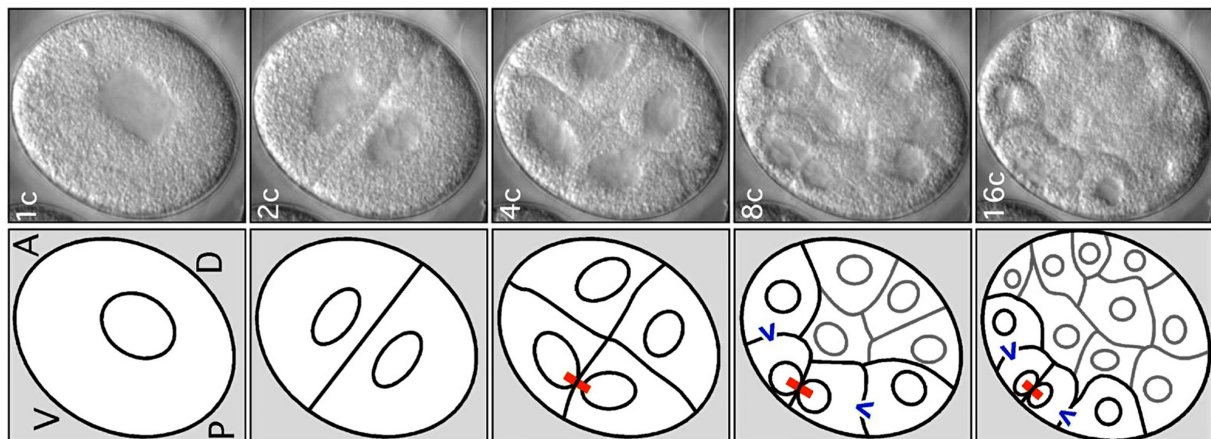


Abb. 54: Asymmetrische Zellteilungen und Kernanordnungen in *H. dujardini*

Abb. modifiziert nach Gabriel et al. (2007). DIC-Aufnahmen; symmetrische Zellteilungen bis zum 4-Zell Stadium. Mit dem 4-Zell Stadium kommt es zu asymmetrischen Kernanordnungen (roter Balken) und asymmetrischen Zellteilungen (blaue Pfeilspitzen) an der ventralen Seite des Embryos.

In einem zukünftigen Projekt soll durch den Vergleich musterbildender Prozesse basaler Nematoden (Clade 1 und 2) mit einem Nematomorphen als Mitglied der nächstverwandten Außengruppe die Basis geschaffen werden, um evolutionäre Innovationen des Entwicklungsprogramms besser zu verstehen. Hierfür sind detaillierte Zellstammbaum-Analysen mit 4-D Mikroskopie, 3-D Modellierung der Musterbildung und Zellelimination mit Lasermikrostrahl zur Aufdeckung von Zellinteraktionen geplant. Ein umfassender Vergleich

musterbildender embryonaler Prozesse bei Nematoden und Nematomorphen mit denen bei Tardigraden und Rotatorien kann die Ecdysozoa-Hypothese möglicherweise noch stärker untermauern. Darüber hinaus bietet eine fundierte embryonale Analyse überhaupt erst die notwendige Grundlage um die Rolle von Entwicklungsgenen, welche für Zellpolarität, Signaltransduktion, Zellspezifikation und Gastrulation verantwortlich sind, in der Evolution von Entwicklungsprozessen zu verstehen.

Sind invariante polyklonale Zellstammbäume typisch für die Gruppe der Rhabditia?

C. elegans (Clade 9) ist der erste Organismus, dessen embryonaler (Sulston et al., 1983) und postembryonaler Zellstammbaum (Kimble und Hirsh, 1979; Sulston und Horvitz, 1977) vollständig analysiert wurde. Weitere ausführliche embryonale Zellstammbaumanalysen liegen lediglich von *P. marina* (Clade 9; Houthoofd et al., 2003), *C. briggsae* (Clade 9; Zhao et al., 2008) und *A. megalocephala* (Clade 8; Boveri, 1899; Müller, 1903) vor. Diesen vier Spezies ist es gemein, dass sie einen invarianten Zellstammbaum mit somatischer Zellkonstanz besitzen. Nichtsdestotrotz konnte durch den Vergleich von *C. elegans* und *P. marina* gezeigt werden, dass die Zellstammbäume nur zu einem gewissen Grad konserviert sind. So kann zwischen diesen beiden Spezies zwar eine 95,5%ige Übereinstimmung der Zellstammbaumverästelungen, aber nur zu 76,4% Übereinstimmung der terminalen Zellschicksale beobachtet werden (Houthoofd et al., 2003). Diese Unterschiede in der Homologie der Zellschicksale werden von den Autoren durch Schicksalstransformationen zwischen beiden Spezies erklärt. Bei *C. elegans* werden die Organe, bis auf den Darm, gemeinsam von mehr als einer Gründerzelle gebildet. Darüber hinaus liefern die meisten Zellstammbaumzweige der Gründerzellen polyklonal Beiträge zu verschiedenen Geweben (Sulston et al., 1983). Computergestützte Zellstammbaumanalysen deuten auf einen Selektionsdruck hin, der zu einer generellen Vereinfachung und Optimierung von polyklonalen Zellstammbäumen führt (Azevedo et al., 2005). Dabei konnten für *C. elegans* eine Reihe von Induktionen aufgedeckt werden, welche für die korrekte Etablierung seines Zellstammbaumes verantwortlich sind (s. Einleitung; Schnabel und Priess, 1997). Auch die in dieser Arbeit begonnenen 4D Analysen von *A. nanus* (Clade 11) und *D. coronatus* (Clade 9) sprechen für einen invarianten Zellstammbaum, wobei die meisten Zellstammbaumzweige der Gründerzellen polyklonal wie bei *C. elegans* Beiträge zu verschiedenen Geweben liefern.

Folglich sprechen die bisher untersuchten Spezies innerhalb der Rhabditia (Claden 7-12) dafür, dass diese Gruppe insgesamt einen invarianten Zellstammbaum besitzt.

Zeigen Spezies an der phylogenetischen Grenze zwischen Rhabditia und Chromadoria nur einen partiell invarianten Zellstammbaum?

Bei den *Plectida* handelt es sich um eine monophyletische Gruppe, welche entweder als eigenständiger Clade, als Gruppe innerhalb der Rhabditia oder als Schwestergruppe zu den Rhabditia dargestellt wird (Holterman et al., 2006; Meldal et al., 2007).

Mit *Plectus* sp. (ES601; Clade 6) wurde in dieser Arbeit eine Spezies an der phylogenetischen Grenze zu den Rhabditia untersucht. Diese Spezies weist zwar eine frühe Trennung von Keimbahn und Soma auf, überraschenderweise habe ich jedoch herausgefunden (Kapitel 4.2.1 und 4.2.2), dass die frühe Musterbildung im Embryo von *Plectus* sp. (ES601) im Vergleich zu *C. elegans* deutlich variabel ist und somit Induktionen, welche in *C. elegans* für die korrekte Etablierung seines Zellstammbaumes verantwortlich sind, nicht stattfinden können. Darüber hinaus deuten die bisherigen 4D Zellstammbaumanalysen sogar darauf hin, dass *Plectus* sp. (ES601) keinen invarianten Zellstammbaum besitzt, sondern Zellschicksale offenbar auch durch einen positionsabhängigen Mechanismus determiniert werden. Des Weiteren scheinen die meisten Zellstammbaumzweige der Gründerzellen in größerem Umfang monoklonal zur Bildung von Geweben beizutragen, als bei den oben beschriebenen Rhabditia beobachtet wird.

Die bisherigen Untersuchungen müssen durch weiterführende 4D Zellstammbaumanalysen von *Plectus* sp. (ES601) und nach Möglichkeit durch einen oder mehrere weitere Vertreter der Chromadoria (Claden 3-6) abgesichert werden, um die Aussagen für diese Gruppe zu verallgemeinern. Nach dem jetzigen Bild stellt *Plectus* sp. (ES601) aber möglicherweise einen evolutionären Übergang zu den Rhabditia mit ihren invarianten Zellstammbäumen dar.

Weisen basale Nematoden hauptsächlich Stammbaumzweige mit monoklonalen Zellschicksalen auf?

Wenige Arbeiten beschäftigen sich mit Spezies innerhalb der Enoplea (Claden 1-2; Borgonie et al., 2000; Malakhov, 1994; Schierenberg, 2005; Voronov, 1999; Voronov und Panchin, 1998). Ausführliche 4D Zellstammbaumanalysen eines Vertreters der Enoplea wurden jedoch bisher nicht durchgeführt. Einleitende Analysen von *T. diversipapillatus* (Clade 1; Schierenberg, 2005), *P. punctatus* (Clade 2b; Borgonie et al., 2000) und *E. brevis* (Clade 1; Voronov und Panchin, 1995) zeigten keine sichtbare Trennung von Keimbahn und Soma. Durch die Injektion eines intrazellulären Markers (Weisblat et al., 1978) konnte für das 8-Zell Stadium von *E. brevis* gezeigt werden, dass lediglich eine Zelle ausschließlich zum Endoderm beiträgt, während die übrigen Zellen in einem nicht reproduzierbaren Muster zu den übrigen Geweben beitragen (Voronov und Panchin, 1998).

Durch die 4D Zellstammbaumanalysen von *R. culicivorax* (Clade 2b) wird gezeigt, dass eine frühe sichtbare Trennung von Keimbahn und Soma stattfindet sowie die somatischen

Gründerzellen Zellkonstanz aufweisen und eine oder mehrere Zellstammbaumzweige mit distinkten Zellzykluslängen bilden. Diese Zellstammbaumzweige tragen aber anders als bei allen bisher analysierten Nematoden weitgehend monoklonal zur Organogenese bei. Nichtsdestotrotz ist der Zellstammbaum von *R. culicivorax* nicht völlig festgelegt, da es Variationen in der Anordnung von Neuronen und Hypodermis gibt sowie Zellen des Hypodermisverbandes sich nicht in Abhängigkeit vom Zellstammbaum, sondern sich ihrer Position entsprechend unterschiedlich verhalten, was für determinierende Induktionen spricht (Kapitel 4.3.15).

Die begonnenen 4D Zellstammbaumanalysen von *Prionchulus sp.* (Clade 2b; Kapitel 4.4.1) und *T. stefanskii* (Clade 1; Kapitel 4.5.1) zeigen im Gegensatz zu ihren in der Literatur beschriebenen nahen Verwandten (Borgonie et al., 2000; Schierenberg, 2005) eine klare Trennung von Keimbahn und Soma. Darüber hinaus gibt es Hinweise für monoklonale Zellstammbaumzweige und dafür, dass Zellschicksale teilweise auch durch einen positionsabhängigen Mechanismus determiniert werden.

Zusammenfassend sprechen die bisherigen Untersuchungen dafür, dass *R. culicivorax* einen partiell invarianten Zellstammbaum besitzt, wobei die Zellstammbaumzweige der Gründerzellen hauptsächlich monoklonal zur Bildung von Geweben beitragen. Die Zellschicksale scheinen teilweise auch durch einen positionsabhängigen Mechanismus determiniert zu werden. Um die Aussagen für die Gruppe der Enoplea zu verallgemeinern, müssen aber die 4D Zellstammbaumanalysen von *T. stefanskii* und *Prionchulus sp.* weiter vorangetrieben werden.

Gibt es einen evolutionären Wechsel von monoklonalen zu polyklonalen aufgebauten Zellstammbaumzweigen?

Während die Organogenese von *C. elegans* (Clade 9) als polyklonal beschrieben werden kann, die meisten Zellstammbaumzweige also polyklonal zu unterschiedlichen Organen beitragen und nur wenige Zweige monoklonal aufgebaut sind, kann die Organogenese von *R. culicivorax* (Clade 2b) als überwiegend monoklonal beschrieben werden (Abb. 56A, B). Die meisten Organe werden hier von einer einzelnen Gründerzelle gebildet und lediglich der Zellstammbaumzweig S1pap scheint polyklonal zu verschiedenen Geweben beizutragen.

Da es sich bei *R. culicivorax* um einen basalen Vertreter des Taxons Nematoda handelt, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei monoklonalen Zellstammbaumzweigen um ein ursprüngliches Merkmal handelt. In ähnlicher Weise trägt jedoch auch die isolierte S1 Zelle der *glp-1* (e2144) Mutante von *C. elegans* ausschließlich monoklonal zu neuronalem Gewebe bei (Abb. 56a'; Hutter und Schnabel, 1995a; 1995b; Schnabel et al., 2006; Sulston et al., 1983), wohingegen der normale polyklonale Beitrag der S1 zu verschiedenen Organen (Abb. 56A) von mindestens fünf frühen Induktionen abhängt (Abb. 4; Schnabel und Priess,

1997). Folglich scheint die monoklonale Spezifizierung von Zellstammbaumzweigen ein ursprüngliches Merkmal zu sein. Auch mathematische Modellierungen von möglichst effizienten Zellstammbäumen sprechen dafür, dass es sich bei polyklonalen Zellstammbäumen um ein abgeleitetes Merkmal handelt (Azevedo et al., 2005). Die zusätzlichen Beobachtungen an *T. stefanskii* (Clade 1), *Prionchulus* sp. (Clade 2b) und *Plectus* sp. (ES601, Clade 6) im Vergleich zu den Rhabditia (Clade 7-12) lassen folglich eine Tendenz zum Wechsel von monoklonalen zu polyklonalen Zellstammbaumzweigen erkennen.

Warum findet aber scheinbar ein evolutionärer Wechsel von monoklonalen zu polyklonalen Zellstammbaumzweigen statt?

Im polyklonalen Zellstammbaum von *C. elegans* sind die terminalen Zellschicksale an ihre Position im Embryo gekoppelt, so dass sie nahe ihrem Bestimmungsort geboren werden und wenige Migrationsbewegungen nötig sind, um diesen zu erreichen (Sulston et al., 1983). Hingegen sind in *R. culicivora* mit seinen monoklonalen Zellstammbaumzweigen die Zellschicksale an die Abstammung vom Zellstammbaum gekoppelt, so dass sie fern von ihrem Bestimmungsort geboren werden und massive Migrationsbewegungen nötig sind, um diesen zu erreichen. Folglich scheinen polyklonale und monoklonale Zellstammbaumzweige einen Kompromiss zwischen der Minimierung notwendiger Zellspezifizierungen bei gleichzeitig massiv auftretenden Wanderungsbewegungen in monoklonalen Zweigen bzw. der Minimierung von solchen Prozessen durch massive Zellspezifizierungen in polyklonalen Zweigen darzustellen (Houthoofd et al., 2003; Stent, 1985). Unter diesem Aspekt stellen *C. elegans* (Clade 9) und *R. culicivora* (Clade 2b) zwei Extreme dar.

Über die evolutionären Gründe für einen solchen evolutionären Wechsel kann nur spekuliert werden, zumal beide Extreme Vorteile bergen. Aber theoretisch erlaubt ein polyklonaler Zellstammbaum eine schnellere Embryonalentwicklung (Houthoofd et al., 2003), weil kaum zeitaufwendige Zellmigrationen nötig sind und eingesparte Zeit direkt in schnellere Entwicklung umgesetzt werden kann. Tatsächlich kann die Tendenz einer immer schnelleren Embryonalentwicklung von basalen hin zu modernen Nematoden beobachtet werden (s. Ergebnisteil; Malakhov, 1994; Voronov, 1999; Voronov und Panchin, 1998). Möglicherweise stellen sie aber auch verschiedene Strategien dar sich an seine spezifische Umwelt anzupassen (Schierenberg, 2001).

Meiner Meinung nach könnte die Geburt der Zellen nahe ihrem Bestimmungsort den Wegfall eines komplexen und energieintensiven Leitsystems zur exakten Migrationssteuerung bedeuten. Neben Energieeinsparungen durch die Minimierung von Migrationsereignissen bietet aber auch Minimalismus generell ein hohes Einsparpotential und möglicherweise evolutionäre Vorteile. Durch die Etablierung eines polyklonalen invarianten Zellstammbaumes mit unter 1000 Zellen, in welchem nur die für den Organismus absolut

notwendigen Zellen gebildet werden, bedeuten weniger Zellen gegenüber der Konkurrenz einen geringeren Nahrungsbedarf und somit einen Selektionsvorteil.

Darüber hinaus könnte ein polyklonaler invarianter Zellstammbaum auch als evolutionärer Meilenstein angesehen werden, denn theoretisch ist hierdurch eine modulare Entwicklung und Evolution eines Organismus möglich. Zellstammbaumzweige können als modulare Bausteine des Organismus im Rahmen der Evolution separat modifiziert, transformiert, verdoppelt, zeitlich in der Entwicklung verschoben werden oder schlicht und einfach wegfallen. Diese Vorstellung passt zu Überlegungen von Raff (1996), wonach ineinander greifende modulare Prozesse und Heterochronie eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung spielen.

Auf der anderen Seite birgt ein polyklonaler invarianter Zellstammbaum jedoch auch Probleme in sich (Houthoofd et al., 2003), denn die nötigen vielfältigen Induktionen bieten eine große Angriffsfläche für Störungen und es gibt keine Möglichkeit eine räumlich oder zeitlich falsche Zellspezifikation wieder auszugleichen oder verlorene Zellen zu ersetzen. Aber auch hier ist möglicherweise einen Ausweg aus einer potentiellen evolutionären Sackgasse gefunden, indem mit *A. nanus* (Clade 11) eine Spezies über die Fähigkeit verfügt verlorene somatische Gründerzellen nach einem hierarchischen Muster zu ersetzen (Wiegner und Schierenberg, 1998; 1999).

Wie könnte ein evolutionärer Wechsel zu polyklonalen Zellstammbaumzweigen abgelaufen sein?

Der Wechsel von monoklonalen zu polyklonal organisierten invarianten Zellstammbaumzweigen wie bei *C. elegans* scheint ein langwieriger Prozess in der Evolution der Nematoden gewesen zu sein. Möglicherweise kommt als erster Schritt eine sekundäre positionsabhängige, d.h. auf Induktionen angewiesene Modifikation eines ansonsten monoklonalen Zellstammbaumzweiges in Frage. Hierfür spricht, dass in *R. culicivora* wenige Zellen des Hypodermisverbandes, in Abhängigkeit von ihrer Position und nicht ihrer Abstammung, im Rahmen der späten Gastrulation einwandern (Kapitel 4.3.15). Weitere Hinweise hierfür gehen auch aus den beginnenden 4D Analysen von *T. stefanskii* (Kapitel 4.5.1) und *Prionchulus* sp. hervor (Kapitel 4.5.1). Sukzessive könnten diese sekundären Modifikationen eine immer wichtigere Rolle in der Embryonalentwicklung eingenommen haben, im Extremfall sogar den primären Mechanismus zur monoklonalen Spezifizierung von Zellstammbaumzweigen überdeckt haben. Die Tatsache, dass bei *C. elegans* die isolierte S1 der *glp-1* (e2144) Mutante ausschließlich monoklonal zu neuronalem Gewebe beiträgt (Abb. 56a'), kann demzufolge als Atavismus interpretiert werden.

Da in *R. culicivora* Zellen entlang der anterior-posterioren Körperachse monoklonal zur Organogenese beitragen (Abb. 56B) und ein genereller Mechanismus zur Etablierung dieser

Körperachse in Nematoden existiert (Abb. 53), könnte eine ursprüngliche monoklonale Spezifizierung der aufgereihten Zellen entlang dieser Achse erfolgen. Als Kandidaten für die Spezifizierung kämen die Hox-Gene in Frage, welche im Tierreich eine entscheidende Rolle bei der Identitätsfestlegung entlang der Längsachse spielen (Carroll, 1995; Wolpert et al., 1999). Jedoch hat sich die Funktion der Hox-Gene in *C. elegans* einem evolutionären Wandel unterzogen und ihre Expression ist nicht mehr abhängig von der Position einer Zelle, sondern von ihrer Abstammung im Zellstammbaum (Cowing und Kenyon, 1996).

Aboobaker und Blaxter (2003a, b) konnten zeigen, dass Hox-Gene in Nematoden weder als Cluster vorliegen, noch konserviert sind (Abb. 55). Sie schlussfolgerten daraus, dass die Hox-Gene in Nematoden nur noch Überbleibsel eines ursprünglichen Regulationssystems darstellen. Als Modell schlugen sie vor, dass die Hox-Gene in Nematoden, aufgrund einer zellstammbaumabhängigen Entwicklung von ihrer essentiellen Kernaufgabe der Positionsidentifizierung freigestellt, neue Funktionen übernehmen oder verloren gehen konnten.

	<i>ceh-13</i>		<i>hox-3</i>		<i>lin-39</i>	<i>mab-5</i>	<i>ant-1</i>			<i>egl-5</i>	<i>php-3</i>	<i>nob-1</i>
Nematoda	<i>Caenorhabditis</i>	X	X	X			X	X	X			
	<i>Pristionchus</i>											
	<i>Strongyloides</i>											
	<i>Meloidogyne</i>											
	<i>Brugia</i>						X	X				
	<i>Ascaris</i>											
	<i>Trichinella</i>											
Nematomorpha	<i>Paragordius</i>											
Onychophora	<i>Acanthokara</i>											
Priapulida	<i>Priapulid</i>											
Hexapoda	<i>Drosophila</i>											
	lab	pb	z2 zen	Dfd	Scr	ftz	Antp	Ubx	abd-A		Abd-B	

Abb. 55: Gegenüberstellung der Hox-Gene in verschiedenen Tiergruppen

Abb. modifiziert nach Aboobaker und Blaxter (2003b). Gene, welche zur selben orthologen Gruppe gehören, sind gleich gefärbt. Ein X zeigt die definitive Abwesenheit des Gens an, in Fällen ohne Markierung war die PCR nicht fähig ein Ortholog zu amplifizieren. Gestrichelte Kästen zeigen Hoxgenfragmente an, welche nicht eindeutig einer orthologen Gruppe zugeordnet werden konnten.

Diese Modellvorstellung passt gut zum oben von mir skizzierten Szenario, dass sekundäre Modifikationen eine immer wichtigere Rolle eingenommen haben könnten und sukzessive den primären Mechanismus zur monoklonalen Spezifizierung von Zellstammbaumzweigen überdeckten.

Ein Ziel zukünftiger Projekte wird es folglich sein, zu prüfen in wie weit Hox-Gene in basalen Nematoden eine entscheidende Rolle bei der Identitätsfestlegung monoklonaler Zellstammbaumzweige entlang der Längsachse spielen. Dazu müssen die „full-length“ Klone aus *R. culicivora* und *T. stefanskii* isoliert werden, um festzustellen, ob basale Nematoden über ein größeres Set an Hox-Genen verfügen. Mittels „in situ“- oder Antikörper-Färbungen kann dann deren Expression entlang der Längsachse des Embryos identifiziert werden.

Gibt es Transformationen im Schicksal der Gründerzellen innerhalb des Taxons Nematoda?

Ein Zellstammbaumvergleich zwischen *C. elegans* und seinen nahen Verwandten (Houthoofd et al., 2003; Müller, 1993; Sulston et al., 1983; Zhao et al., 2008) zeigt nur marginale Transformationen einzeln auftretender Schicksale innerhalb der Gründerzellen. Ein Vergleich zwischen phylogenetisch entfernten Vertretern des Taxon Nematoda zeigt jedoch gravierende Unterschiede, so liegt der Ursprung des Darms in *C. elegans* und seinen nahen Verwandten in der Gründerzelle S2p (E) (Houthoofd et al., 2006; Müller, 1993; Sulston et al., 1983; Wiegner und Schierenberg, 1998), bei basalen Vertretern des Taxons (Clade 1+2) stammt er jedoch von der Gründerzelle S1p (ABp) ab (Malakhov, 1994; Voronov, 1999; Voronov und Panchin, 1998).

Die Analysen des Zellstammbaums (Kapitel 4.3.10) und der frühen Musterbildung (Kapitel 4.3.6) von *R. culicivora* decken weitere massive Schicksalstransformationen zwischen einzelnen Gründerzellen im Vergleich mit *C. elegans* und *A. nanus* auf (Abb. 56). Durch die Einführung einer zweiten Nomenklatur (S-Nomenklatur; Boveri, 1899; 1910) wird die Unterscheidung zwischen und Entkopplung von Abstammung und Schicksal im invarianten Zellstammbaum ermöglicht. Die Abstammung einer somatischen Gründerzelle wurde in dieser Arbeit deshalb wertneutral mit S1-S4 und P1-P4 bezeichnet und trifft abgesehen von der Keimbahn keinerlei Aussagen über ihr Schicksal (Abb. 56A-C). Das Schicksal der Gründerzellen wurde entsprechend der AB-Nomenklatur (Deppe et al., 1978; Sulston et al., 1983; AB, E, MS, C, D und P) bezeichnet (Abb. 56a-c).

Während *R. culicivora* die somatischen Gründerzellen (S1-S4) ähnlich wie *C. elegans* und *A. nanus* in einer Reihe von stammzellartigen Teilungen entlang der anterior-posterioren Körperachse bildet, unterscheiden sich deren Schicksale (AB, EMS, C, D) dramatisch.

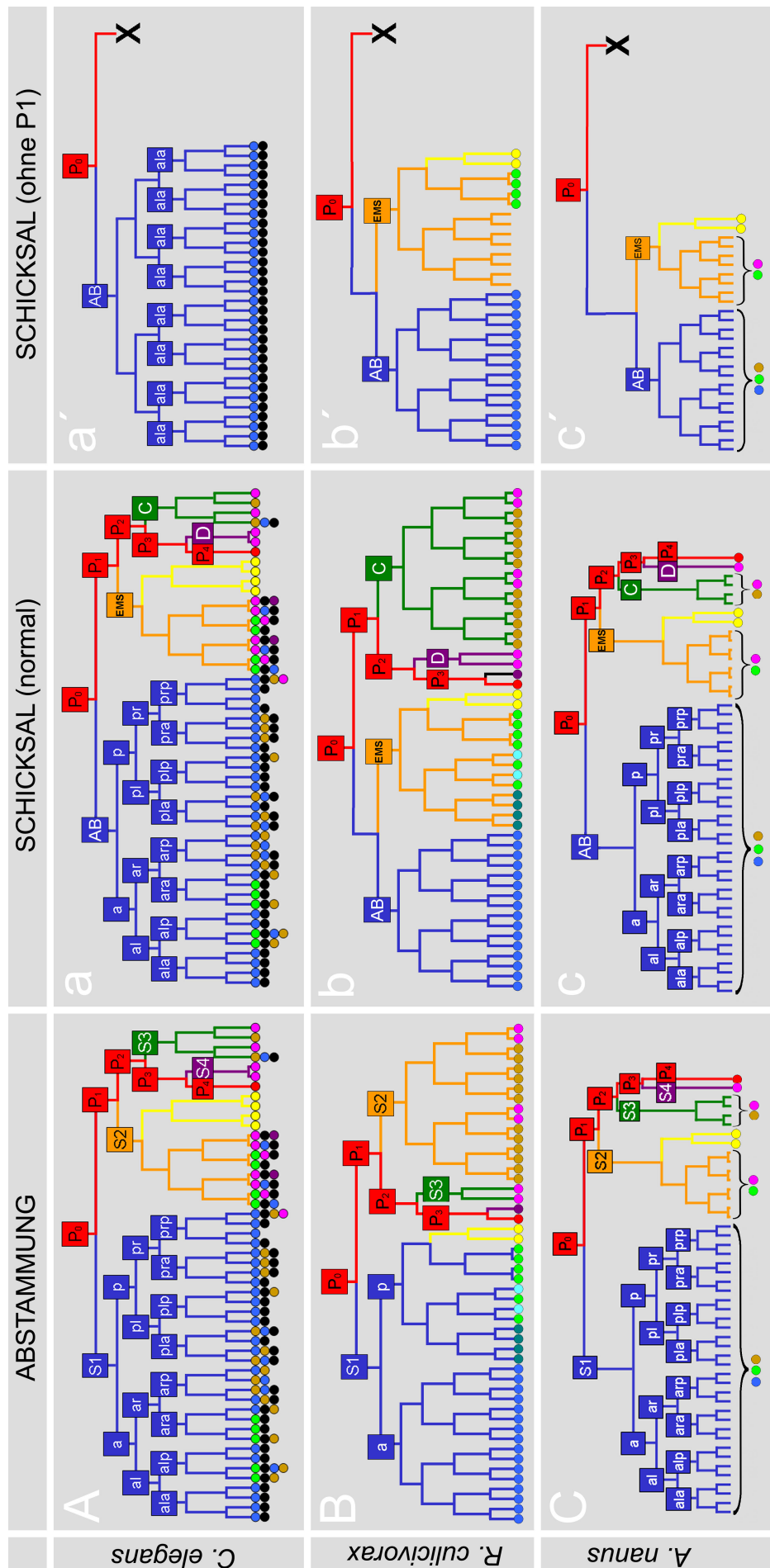
So verhält sich die Zelle S1a (Abb. 56B) in *R. culicivora* ähnlich wie die Gründerzelle S1 in *C. elegans* (Abb. 56A), beide tragen zu neuronalem Gewebe bei. Durch Analyse der Nachkommen einer isolierten S1 Zelle der *glp-1* (e2144) Mutante von *C. elegans* wird ersichtlich, dass diese ausschließlich monoklonal zu neuronalem Gewebe beiträgt (Abb. 56a'; Hutter und Schnabel, 1995a + b; Schnabel et al., 2006; Sulston et al., 1983). Der polyklonale Beitrag der S1 in *C. elegans* zu verschiedenen Organen (Abb. 56A), hängt von mindestens fünf frühen Induktionen ab (s. Einleitung; Schnabel et al., 1997). Deren Ausfall führt dazu,

dass anstatt der acht unterschiedlichen AB-Schicksale „ala“, „alp“, „ara“, „arp“, „pla“, „plp“, „pra“ und „prp“ mit ihren invarianten Nachkommen (Sulston et al., 1983) lediglich achtmal das AB-Schicksal „ala“ und somit ausschließlich neuronales Gewebe gebildet wird (Abb. 56a'; Schnabel et al., 2006; Sulston et al., 1983). Folglich kann das „ABala“ Schicksal mit seinem monoklonalen Beitrag zu neuronalem Gewebe als ursprüngliches AB-Schicksal angesehen werden. Von diesem Gesichtspunkt aus verhalten sich die S1 in *C. elegans* (Abb. 56a') und die S1a in *R. culicivora* (Abb. 56B) absolut gleich, beide tragen das Schicksal „AB“ (blau) in sich (Abb. 56a, b).

Die Zelle S1p in *R. culicivora* (Abb. 56B) verhält sich ähnlich wie die Gründerzelle S2 in *C. elegans* (Abb. 56A). Beide teilen sich entlang der anterior-posterioren Körperachse (Abb. 31), ihre Tochterzellen weisen jeweils unterschiedliche Zellteilungsrhythmen auf und tragen zu unterschiedlichen Schicksalen bei (Abb. 56A, B). Sie bilden den Verdauungstrakt. Ein Unterschied liegt im Beitrag der S2 von *C. elegans* zu dessen Körpermuskulatur, welche bei Zellisolation von S2 autonom auftritt (Schnabel, 1994; 1995). Laserablationsexperimente zeigten jedoch, dass im Embryo von *C. elegans* aktivierende und inhibierende Induktionen für die Körpermuskelspezifizierung in S2 nötig sind und diese zusammen mit dem autonomen Verhalten der isolierten Zelle möglicherweise eine gerade stattfindende Evolution der Zellspezifizierung von Körpermuskulatur aufzeigen (Schnabel, 1995). Abgesehen davon verhalten sich S2 in *C. elegans* und S1p in *R. culicivora* sehr ähnlich, beide tragen das Schicksal „EMS“ (orange) in sich (Abb. 56a, b).

Die Zelle S2 in *R. culicivora* (Abb. 56B) verhält sich ähnlich wie die Gründerzelle S3 in *C. elegans* (Abb. 56A), beide tragen zu Hypodermis und Körpermuskulatur bei, beide tragen das Schicksal „C“ (dunkelgrün) in sich (Abb. 56a, b).

Die Gründerzelle S3 in *R. culicivora* (Abb. 56B) verhält sich absolut gleich wie S4 in *C. elegans* (Abb. 56A), beide tragen monoklonal zur Körpermuskulatur bei, beide tragen das Schicksal „D“ (violett) in sich (Abb. 56a, b).



Zellstammbäume von *C. elegans*, *R. culicivora* und *A. nanus*, unterteilt nach Abstammung (S-Nomenklatur) und Schicksal (AB-Nomenklatur) der Gründerzellen in unmanipulierten und manipulierten Embryonen. A, a) modifiziert nach Sulston et al. (1983), a') Isolierte glp-1 (e2144) S1 Zelle, modifiziert nach (Hutter and Schnabel, 1995a; Schnabel et al., 2006; Sulston et al., 1983), c') modifiziert nach (Wiegner und Schierenberg (1998; 1999). Tochterzellen mit anteriorer, dorsaler und linker Position, relativ zu ihrer Geschwisterzelle, werden einem linken Zweig, Zellen mit posteriorer, ventraler und rechter Position einem rechten Zweig des Stammbaums zugeordnet. Die endständigen Kreise stellen in absteigender Häufigkeit die aus 4D Analyse und Zentrifugationsexperimenten analysierten Schicksale der aus weiteren Teilungen resultierenden Tochterzellen farblich (Farbcode: Abb. 36c) dar.

Die Gründerzellen S4 sowie P4 in *R. culicivorax* (Abb. 56B) teilen sich jeweils nur ein einziges Mal entlang der anterior-posterioren Körperachse und ihre Tochterzellen wandern assoziiert mit dem Darm im Rahmen der Gastrulation ins Innere des Embryos ein (Abb. 38a-d'). Bis zum 372-Zellstadium kann keine weitere Zellteilung ihrer Nachkommen beobachtet werden, danach können sie aufgrund der mangelnden Transparenz des Embryos nicht weiter verfolgt werden. Die Zeit die seit ihrer letzten Zellteilung vergangen ist, welche dem doppelten der vorhergehenden Zellzykluslänge entspricht, lässt weitere Zellteilungen jedoch unwahrscheinlich erscheinen. Die S4 Tochterzellen könnten daher die somatische Gonade bilden, welche in *C. elegans* auch nur von den beiden Zellen Z1 + Z4 gebildet werden (Abb. 56A; Sulston et al., 1983). Folglich hat die Gründerzelle S4 in *R. culicivorax* keine Analogie in *C. elegans* und scheint ein neues Schicksal „F“ (schwarz) zu definieren. Die P4 Tochterzellen in *R. culicivorax* scheinen den Keimbahnvorläuferzellen Z2 und Z3 in *C. elegans* zu entsprechen (Sulston et al., 1983).

In *A. nanus* trägt die S1 polyklonal zu Hypodermis, Neuronen und Pharynx bei (Abb. 56C und 16) und verhält sich somit sehr ähnlich wie S1 in *C. elegans* (Abb. 56A und 5), beide tragen das Schicksal „AB“ (blau) in sich (Abb. 56a, c). Aufschlussreich sind in diesem Zusammenhang Experimente an *A. nanus* (Wiegner und Schierenberg, 1998; 1999), welche zeigen, dass sich dessen Gründerzellen in einem hierarchischen Muster ersetzen können. Nach Laserablation von S1 übernimmt S2 das Schicksal „AB“, S3 das Schicksal „EMS“, S4 das Schicksal „C“ (nicht gezeigt) und lebensfähige fertile Würmer können schlüpfen, denen lediglich 20 Körpermuskelzellen fehlen, welche normalerweise von S4 („D“) abstammen (Abb. 56c). Nach Isolation der Gründerzelle S1 von *A. nanus* (Abb. 56c') verhalten sich ihre Tochterzellen S1a und S1p wie AB und EMS (Abb. 56a, c) und folglich auch sehr ähnlich den unmanipulierten Tochterzellen der S1 in *R. culicivorax* (Abb. 56b).

Aus den somatischen Gründerzellen (S1-S4), die entlang der Mittellinie entstehen und diese definieren, gehen in *C. elegans*, *R. culicivorax* und *A. nanus* zwar in etwa dieselben Schicksale (AB, EMS, C und D) hervor und werden bei *C. elegans* (vermutlich auch bei *A. nanus*) lediglich sekundär durch Induktionen modifiziert. Jedoch ist es zwischen *R. culicivorax* und *C. elegans* zu massiven Schicksalstransformationen zwischen den einzelnen Gründerzellen gekommen. So entspricht in *C. elegans* die Gründerzelle S1 dem Schicksal „AB“, S2 dem Schicksal „EMS“, S3 dem Schicksal „C“ und S4 dem Schicksal „D“, während bei *R. culicivorax* S1 dem Schicksal „AB“ + „EMS“ entspricht, S2 dem Schicksal „C“, S3 dem Schicksal „D“ und S4 dem in *C. elegans* unbekannten Schicksal „F“ (möglicherweise somatische Gonade; Abb. 56a-c). Durch die Polaritätsumkehr in der Keimbahn, welche in *R. culicivorax* bereits in P1 anstatt in P2 wie bei *C. elegans* stattfindet, bzw. eine aktive Wanderung der Keimbahnzelle P4 zur Darmvorläuferzelle in *A. nanus* stattfindet, ist die

Anordnung der Schicksale entlang der Mittellinie bei allen drei Spezies jedoch gleich [AB-EMS-P4-(F)-C-D]. Ein zumindest für *C. elegans* zur Darminduktion wichtiger Darm-Keimbahn Kontakt ist somit hergestellt (Goldstein, 1992; Schierenberg, 1987). Ebenso wie eine gerade stattfindende evolutionäre Veränderung der Zellspezifizierung von Körpermuskulatur bei *C. elegans* postuliert wurde (Schnabel, 1995), könnte die Fähigkeit von *A. nanus* Gründerzellen in einem hierarchischen Muster zu ersetzen (Abb. 56c'), in gleichem Sinne interpretiert werden. Möglicherweise spiegelt die isoliert betrachtete S1 in *A. nanus* einen ursprünglichen, noch im Hintergrund aktiven Mechanismus der Zellspezifizierung von Gründerzellen wider, wie er in *R. culicivora* noch zu finden ist, welcher lediglich durch ein neues übergeordnetes Programm verdeckt ist.

Ist die braune Farbkomponente ein Sonnenschutz für die *Romanomermis*-Larve?

Der auffälligste Unterschied zwischen *C. elegans* (Clade 9) und *R. culicivora* (Clade 2b) beschreibt auch gleichzeitig ein für die Nematoda bisher einzigartiges Phänomen, eine reproduzierbare zuerst asymmetrische Segregation eines zytoplasmatischen Pigments, welches dann gleichmäßig unter den Nachkommen von S2 verteilt wird (Kapitel 4.3.2). Dieser Segregationsprozess startet in der späten Interphase von P0 mit der Verschiebung des Pigments zum posterioren Pol der Zelle und erinnert an die asymmetrische Verteilung der keimbahnspezifischen P-Granula in *C. elegans*, welche mikrofilamentabhängig vor der Mitose zum posterioren Pol von P0 gelangen (Strome und Wood, 1983). In *C. elegans* geht die asymmetrische Verteilung der P-Granula mit der Aufrechterhaltung des Keimbahnschicksals einher und auch bei der Farbkomponente von *R. culicivora* könnte es sich um eine mögliche Determinante handeln, zumal aus S2 die komplette Hypodermis und ein Teil der Körpermuskulatur (Abb. 56B) hervorgeht.

Eine vergleichbare zytoplasmatische Segregation einer Farbkomponente wurde auch bei Ascidienembryonen beobachtet, in welchen braunes Myoplasma in die zukünftigen Körpermuskelzellen gelangt (Conklin, 1905; Jeffery und Swalla, 1997). Dieser Prozess ist jedoch nicht identisch zu dem bei *R. culicivora*. In beiden Spezies findet zwar die asymmetrische Verteilung nur während der frühen Zellteilungen und ausschließlich in solchen Zellen mit anterior-posteriorer Spindelorientierung statt, so dass die Farbkomponente nur in zwei Zellen des 8-Zell Stadiums zu finden ist. Aber in Ascidien enthält die Farbkomponente eine morphogenetische Determinante und eine Fehlverteilung führt zur Ausbildung zusätzlicher Körpermuskelzellen (Whittaker 1983, Nishida 1992). Die experimentelle Fehlverteilung des braunen Pigments in *R. culicivora* gibt jedoch keinerlei Hinweis auf einen determinierenden Einfluss (Kapitel 4.3.3). Es bleibt die Frage zu klären, welche Funktion die reproduzierbar verteilte Farbkomponente in der Normalentwicklung von *R. culicivora* stattdessen hat.

Die histologischen Befunde (Kapitel 4.3.4) liefern einen guten Hinweis, dass es sich bei der Farbkomponente um Melanin handelt. Die Zellstammbaumanalysen (Kapitel 4.3.10) zeigen, dass das Pigment in der normalen Embryogenese von *R. culicivorax* zum größten Teil in die spätere Hypodermis gelangt und legen eine Funktion als Sonnenschutz nahe. Da der geschlüpfte Präparasit bis zu zwei Tagen knapp unter der Wasseroberfläche auf seine Wirte lauert, erscheint ein Schutz vor exzessiver UV-Strahlung sinnvoll. Ein ähnlicher Schutzmechanismus wurde für knapp unter der Wasseroberfläche reifende Amphibieneier vorgeschlagen, wo sich in der animalen Hemisphäre Melanin anreichert (Duellman und Trueb, 1986). Nichtsdestotrotz spielen im Tierreich Pigmente generell eine wichtige Rolle, so ist unter anderem für Arthropoden über die Produktion von Melanin als initiale Immunantwort berichtet worden (Christensen et al., 2005).

Um die beobachtete Farbsegregation als ein für *R. culicivorax* spezifisches Phänomen auszuschließen, wurden zwei seiner nahen Verwandten, *Romanomermis iyengari* und *Strelkovimermis spiculatus* (alle Clade 2b), untersucht. Alle drei Mermithiden-Spezies zeigen die frühe asymmetrische Segregation eines braunen Pigments, welches dann gleichmäßig unter den Nachkommen von S2 verteilt wird. In einer weiterführende Untersuchung verschiedener Vertreter der Mononchida und Dorylaimida (beide Clade 2b) konnte ich hingegen kein braunes Pigment beobachten, so dass es sich möglicherweise um ein für Mermithiden spezifisches Phänomen handelt.

Gibt es ein bisher unbeschriebenes MTOC in Nematoden?

Meine Untersuchungen offenbarten eine bisher in der Literatur noch nicht beschriebene kappenförmig organisierte Mikrotubulstruktur, welche in der Interphase von P0-P2, S1, S1a, S1p und S1pp beobachtet wurde. Ausgehend von einer ringförmigen Zellkortexstruktur strahlen Interphasemikrotubuli polar aus. Die Kappen werden mit dem Ende der Interphase schwächer, während sich gleichzeitig Mikrotubuli um das Centrosom anlagern, und fehlen während der Mitosephase vollständig (Abb. 34). Vermutlich handelt es sich hierbei um ein bisher unidentifiziertes MTOC, welches aufgrund der gleichzeitigen Antikörpermarkierung von Mikrotubulikappe und der Mikrotubuli um das Centrosomen unabhängig vom mitotischen Spindelapparat der Zellen ist. Ein für *R. culicivorax* spezifisches Phänomen der Kappen-MTOC kann ausgeschlossen werden, da diese Struktur auch im verwandten *S. spiculatus* (Clade 2b) nachgewiesen werden konnte. Sie hat entfernte Ähnlichkeit zu Interphasemikrotubuli, welche in parasitären Protozoen wie *D. oweni* (Dyson et al., 1994) und *L. tuzetae* (Kuriyama et al., 2005) gefunden wurden. Subpelliculare Mikrotubulifasern werden hier ausgehend von einem MTOC, dem apikalen Polarring, in direkter Nachbarschaft zum Conoid organisiert und bleiben parallel mit der Ausbildung von Spindelmikrotubuli bestehen (Morrisette und Sibley, 2002). Die Kappen-MTOC weisen aber auch eine gewisse

Ähnlichkeit zur anterior-posterioren Organisation von Mikrotubuli in *D. melanogaster* auf, welche für die asymmetrische Verteilung von zytoplasmatischen Faktoren entlang der Längsachse der Oocyte verantwortlich sind (Steinhauer und Kalderon, 2006).

Da die Lage aller beobachteten Mikrotubulikappen in *R. culicivora* polar ist, und diese in P0 gegenüber dem meiotischen Midbody, in P1 und P2 sowie S1, S1p und S1pp gegenüber der RFM bzw. in S1a gegenüber dem aus der S1 Teilung resultierenden Midbody liegen, scheint eine räumliche Korrelation zwischen Midbody und Mikrotubulikappe zu bestehen. Möglicherweise existiert in den Zellen ein Mechanismus, welcher zuerst kontrolliert, ob ein Kappen-MTOC etabliert werden soll, und diesen dann in maximaler Entfernung zum Midbody etabliert. Im Falle der RFM, welche ohnehin eine wichtige Funktion in *R. culicivora* ausfüllt (Kapitel 4.3.7), könnte ein solcher Mechanismus sogar über mehrere Zellgenerationen hinweg wirken.

Auffällig ist, dass alle von mir untersuchten Nematoden ihre anterior-posteriore Körperachse durch eine Zellreihe an der ventralen Seite des Embryos bilden (Abb. 53) und die beobachteten Kappen-MTOC in *R. culicivora* genau entlang dieser Achse ausgerichtet sind. Handelt es sich möglicherweise um einen für die Nematoden ursprünglichen Mechanismus zur Etablierung von asymmetrischer Polarität in Zellen entlang dieser Achse? Obwohl ein PAR-System in Kombination mit asymmetrischen Zugkräften in P0 entlang dieser Achse wie in *C. elegans* in vielen basalen Spezies nicht vorhanden sein kann (s. weiter oben in der Diskussion), teilen sich mit Ausnahme von S1a alle Zellen mit einem Kappen-MTOC entlang der anterior-posterioren Körperachse in Tochterzellen mit unterschiedlichen Entwicklungsprogrammen. Außerdem korreliert das Auftauchen der Kappen-MTOC mit einer asymmetrischen Verteilung von zytoplasmatischen Komponenten (Kapitel 4.3.2 und 4.3.3) entlang dieser Achse.

Tatsächlich sind Mikrotubuli prominente Elemente der Zellteilung, -migration und -polarität. Sie dienen als Transportschienen für Vesikel, Organellen, Zytoskelettelemente, Proteinkomplexe und mRNA. In den meisten differenzierten tierischen Zellen, wie in Muskeln, Epithelien oder neuronalem Gewebe, sowie den meisten Pilzen und Gefäßpflanzen spielen sie, nicht centrosomal organisiert, entlang einer Achse eine wichtige Rolle. Dabei sind die Mikrotubuli in differenzierten Zellen meist stabilisiert und somit langlebig (Bartolini und Gundersen, 2006).

Möglicherweise bieten die Kappen-MTOC in *R. culicivora* die Möglichkeit die Vorteile eines Mikrotubuli-Schienennetzes während der Interphase transient zu nutzen.

Ein Ziel zukünftiger Projekte wird es sein, die Kappen-MTOC funktionell und strukturell aufzuklären. Eine asymmetrische Verteilung von mRNA entlang dieser Strukturen muss mit Markern analysiert werden. Eine Behandlung mit Colchicin, welches zum Ende der Interphase ausgewaschen wird, oder Kälteimpulse während der Interphase (Schlicht und

Schierenberg, 1991) würden Möglichkeiten bieten die Kappen-MTOC gezielt in der Interphase zu depolymerisieren, ohne die Zellteilung zu verhindern, und somit funktionelle Analysen erlauben. Eine gerade begonnene Kooperation mit Thomas Müller-Reichert vom MPI für „Molecular Cell Biology and Genetics“ in Dresden soll mit Hilfe eines speziellen Hochdruckgefrierungsverfahrens (McDonald et al., 2007) und EM Analysen die Struktur der Kappen-MTOC aufklären.

Ist die Gastrulation unter Beteiligung eines Blastocoels für Nematoden ursprünglich?

Die Gastrulation unter Beteiligung eines Blastocoels ist im gesamten Tierreich weit verbreitet (Stern, 2004; Wolpert et al., 1999). Im Gegensatz dazu galt für die Gastrulation der Nematoden, hauptsächlich geprägt durch die Erkenntnisse über *C. elegans* (Clade 9) und *A. megalocephala* (Clade 8), lange Zeit die Abwesenheit eines Blastocoels als typisch. Erst mit der Untersuchung von *T. diversipapillatus* (Clade 1) konnte ein erster Vertreter der Nematoda beschrieben werden, der eine Gastrulation unter Beteiligung eines großen Blastocoels durchläuft (Schierenberg, 2005). Inzwischen konnten im Rahmen dieser Arbeit und durch die Untersuchung von *T. spiralis* (Clade 2a; Ewald, 2007) eine ganze Reihe von Nematoden beobachtet werden [*T. stefanskii* (Clade 1), *T. muris* (Clade 2a), *Panagrolaimus* sp. (ES444; Clade 10) und *Acrobeloides* sp. (PS1146; Clade 11)], bei denen die Gastrulation unter Beteiligung eines unterschiedlich stark ausgeprägten Blastocoels abläuft. Die Beobachtungen lassen darauf schließen, dass dieser Modus ursprünglich ist und die Abläufe in *C. elegans* und *A. megalocephala* apomorph sind. Die Verteilung der Spezies mit ursprünglichem Gastrulationstyp legt nahe, dass sich der *C. elegans*-Typ mehrmals unabhängig ausgebildet hat.

Interessanterweise sehen einige Autoren den 8-Zell Embryo von *C. elegans* als einlagige Blastula mit rudimentärem Blastocoel, in welchem die korrekte apicobasale Verteilung der PAR-Proteine für eine asymmetrische Zelladhäsion nötig ist (Abb. 3f; Nance et al., 2003; Nance und Priess, 2004; Reese et al., 2000). Dabei kann ein rudimentäres Blastocoel, in Form von kleinen, mit Flüssigkeit gefüllten Hohlräumen auch in einer Reihe von weiteren Spezies wie *A. nanus* (Clade 11) gefunden werden. Somit bilden möglicherweise doch alle Nematoden ein Blastocoel aus, was allerdings in den allermeisten Fällen nur noch rudimentär angelegt wird.

6. Zusammenfassung

Nematoden stellen exzellente Kandidaten für vergleichende Untersuchungen der frühen Embryogenese dar. Unsere Vorstellung über ihre Embryonalentwicklung ist jedoch bis heute maßgeblich durch *Caenorhabditis elegans* und *Ascaris megalocephala* geprägt. Deren Entwicklungsmuster wird deswegen üblicherweise als typisch für das gesamte Taxon angesehen. Die hier vorgestellten Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Embryogenese der Nematoden unerwartet variabel und facettenreich ist, mit vielen Zwischenformen und fließenden Übergängen, welche als Momentaufnahmen eines evolutionären Wandels interpretiert werden können.

Im Zentrum dieser Arbeit steht der basale Nematode *Romanomermis culicivorax*, durch dessen Untersuchung eine Reihe von unerwarteten Phänomenen zu Tage gefördert wurde. Eine für Nematoden bisher unbeschriebene Segregation von farbigem Zytoplasma in eine spezifische somatische Gründerzelle und ihre Nachkommen ähnelt der Verteilung von pigmentiertem Myoplasma bei einigen Ascidien. Durch ihre experimentell induzierte Fehlverteilung kann jedoch gezeigt werden, dass die Farbkomponente im Gegensatz zu den Tunikaten keine Bedeutung für die Zellspezifikation hat. Die erstmalige Beobachtung von polar organisierten Interphasemikrotubuli in frühen Blastomeren deutet auf ein bisher unbeschriebenes MTOC hin, welches an der asymmetrischen Verteilung der Farbkomponente beteiligt ist. Eine Zellcortexregion um den ersten mitotischen Midbody („region of first midbody“, RFM) erfüllt offenbar über mehrere Zellgenerationen hinweg eine wichtige Funktion. Die laserinduzierte Ablation der RFM geht einher mit dem Verlust der Fähigkeit farbiges Zytoplasma asymmetrisch zu verteilen, mitotische Spindeln korrekt entlang der anterior-posterioren Achse auszurichten und asymmetrische Zellteilungen durchzuführen. Im Gegensatz zu *C. elegans* tragen bei *R. culicivorax* Stammbaumzweige größtenteils monoklonal zu Zellschicksalen bei. Darüber hinaus erinnert das Muster der hypodermalen und neuronalen Zellen mit der sukzessiven Bildung von Zellringen entlang der a-p Achse mehr an Segmentierung als alles bisher in Nematoden Beschriebene.

4D-Zeitrafferaufnahmen, 3D-Modellierungen und Zellstammbaumanalysen in verschiedenen Spezies ermöglichen hier einen detaillierten Vergleich musterbildender Prozesse und erlauben es, diese auch als mögliche phylogenetische Marker heranzuziehen. Sie decken massive Transformationen in den Schicksalen somatischer Gründerzellen auf und deuten einen evolutionären Trend von monoklonal hin zu polyklonal aufgebauten Zellstammbaumzweigen an. Dies unterstützt die Vorstellung, dass es sich bei *C. elegans* um einen stark abgeleiteten Vertreter handelt, der nicht als repräsentativ für das gesamte Taxon gelten kann. Jedoch finden sich bei den hier betrachteten Spezies auch grundlegende Gemeinsamkeiten in der Embryonalentwicklung, wie z.B. eine frühe Trennung von Keimbahn

und Soma entlang der anterior-posterioren Körperachse, wodurch eine zukünftige ventrale Mittellinie festgelegt wird.

Basierend auf den in dieser Arbeit vorgestellten Beobachtungen werden Erklärungen vorgeschlagen, wie und warum ein evolutionärer Wechsel in musterbildenden Prozessen stattgefunden hat, sich polyklonale Zellstammbäume entwickelt haben und es zu Schicksalsverschiebungen zwischen somatischen Gründerzellen gekommen ist. Ein erster Vergleich zwischen einem weiteren basalen Nematoden (*Tobrilus stefanskii*) und dem kürzlich in der Literatur beschriebenen Tardigraden *Hypsibius dujardini* bezüglich musterbildender Prozesse im frühen Embryo ergab deutliche Ähnlichkeiten. Dies kann als eine embryologische Unterstützung der Ecdysozoa-Hypothese aufgefasst werden.

7. Abstract

Nematodes constitute excellent candidates for comparative studies of early embryogenesis. Our picture of their embryonic development is shaped until today by *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris megalocephala*. Their pattern of development is therefore considered typical for the whole taxon.

The studies reported here show, however, that embryogenesis in nematodes is unexpectedly variable and multi-faceted with many intermediate forms and floating transitions which can be interpreted as frozen images of evolutionary change.

In the center of this work is the basal nematode *Romanomermis culicivorax*, the investigation of which revealed a number of unexpected phenomena.

A segregation of colored cytoplasm into a specific somatic founder cell and its descendants, so far undescribed in nematodes, resembles the distribution of pigmented myoplasm in certain ascidians. Their experimentally induced missegregation shows, however, that in contrast to tunicates the pigment is not relevant here for cell specification.

The polarly organized interphase microtubules in early blastomeres, described here for the first time, suggest a new MTOC involved in the asymmetric distribution of the colored pigment. A cortex region around the first midbody ("region of first midbody; RFM) fulfills apparently an important function through several cell generations. Laser-induced ablation of the RFM goes along with the loss of the ability for asymmetric segregation of colored cytoplasm, orientation of mitotic spindles along the anterior-posterior axis and to execution of asymmetric cell divisions. In contrast to *C. elegans*, cell lineage branches generate predominantly cells with monoclonal fates. In addition, hypodermal and neuronal cells forming successively rings along the a-p axis resemble segmentation more than anything else observed in nematodes, so far.

4D time lapse recordings, 3D modeling and cell lineage analysis of various species allow a detailed comparison of pattern forming processes and to test these for their suitability as phylogenetic markers. They uncover prominent fate transformations of somatic founder cells and indicate an evolutionary trend from monoclonally to polyclonally inherited cell fates.

This supports the assumption that *C. elegans* is a strongly derived species not representative for nematodes in general.

Nevertheless, basic similarities with respect to embryogenesis are found among the species considered here, e.g. early separation of soma from germline along the a-p axis, whereby a future ventral midline is established.

Based on the observations reported here explanations are suggested how and why evolutionary changes in pattern forming processes did take place, polyclonal cell lineages arose and cell fate shifts among somatic founder cells were implemented. A first comparison between another basal nematode (*Tobrilus stefanski*) and published data on the tardigrade

Hypsibius dujardini concerning early pattern formation revealed obvious similarities. This may be considered as an embryological support for the Ecdysozoa hypothesis.

8. Literaturverzeichnis

- Aboobaker, A.A. and Blaxter, M.L. 2003a. Hox gene evolution in nematodes: novelty conserved. *Curr Opin Genet Dev* 13(6): 593-598.
- Aboobaker, A.A. and Blaxter, M.L. 2003b. Hox Gene Loss during Dynamic Evolution of the Nematode Cluster. *Curr Biol* 13(1): 37-40.
- Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot, N., Lespinet, O., Prud'homme, B., and de Rosa, R. 2000. The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(9): 4453-4456.
- Aguinaldo, A.M., Turbeville, J.M., Linford, L.S., Rivera, M.C., Garey, J.R., Raff, R.A., and Lake, J.A. 1997. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* 387(6632): 489-493.
- Azevedo, R.B., Lohaus, R., Braun, V., Gumbel, M., Umamaheshwar, M., Agapow, P.M., Houthoofd, W., Platzer, U., Borgonie, G., Meinzer, H.P., and Leroi, A.M. 2005. The simplicity of metazoan cell lineages. *Nature* 433(7022): 152-156.
- Badrinath, A.S. and White, J.G. 2003. Contrasting patterns of mitochondrial redistribution in the early lineages of *Caenorhabditis elegans* and *Acrobelloides* sp. (PS1146). *Dev Biol* 258(1): 70-75.
- Bartolini, F. and Gundersen, G.G. 2006. Generation of noncentrosomal microtubule arrays. *J Cell Sci* 119(Pt 20): 4155-4163.
- Bei, Y., Hogan, J., Berkowitz, L.A., Soto, M., Rocheleau, C.E., Pang, K.M., Collins, J., and Mello, C.C. 2002. SRC-1 and Wnt signaling act together to specify endoderm and to control cleavage orientation in early *C. elegans* embryos. *Dev Cell* 3(1): 113-125.
- Berkowitz, L.A. and Strome, S. 2000. MES-1, a protein required for unequal divisions of the germline in early *C. elegans* embryos, resembles receptor tyrosine kinases and is localized to the boundary between the germline and gut cells. *Development* 127(20): 4419-4431.
- Bischoff, M. and Schnabel, R. 2006. Global cell sorting is mediated by local cell-cell interactions in the *C. elegans* embryo. *Dev Biol* 294(2): 432-444.
- Blaxter, M.L., De Ley, P., Garey, J.R., Liu, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vida, J.T., and Thomas, W.K. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392(6671): 71-75.
- Bolker, J.A. 1995. Model systems in developmental biology. *Bioessays* 17(5): 451-455.
- Borgonie, G., Jacobsen, K., and Coomans, A. 2000. Embryonic lineage evolution in nematodes. *Nematology* 2: 65-69.
- Bossinger, O. and Schierenberg, E. 1996. Early embryonic induction in *C. elegans* can be inhibited with polysulfated hydrocarbon dyes. *Dev Biol* 176(1): 17-21.
- Boveri, T. 1887. Über die Differenzierung der Zellkerne während der Furchung des Eies von *Ascaris megalocephala*. *Anat Anzeiger* 2: 668-693.
- Boveri, T. 1892. Über die Entstehung des Gegensatzes zwischen den Geschlechtszellen und somatischen Zellen bei *Ascaris megalocephala*. *Sitber Ges Morph Physiol München* 8: 114-125.
- Boveri, T. 1899. Die Entwicklung von *Ascaris megalocephala* mit besonderer Rücksicht auf die Kernverhältnisse. In: *Festschrift für C. v. Kupffer* Gustav Fischer Verlag, Jena: 383-430.
- Boveri, T. 1910. Die Potenzen der *Ascaris* Blastomeren bei abgeänderter Furchung. Zugleich ein Beitrag zur Frage qualitativ ungleicher Chromosomenverteilung. In: *Festschrift für C. v. Kupffer* Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Bowerman, B., Tax, F.E., Thomas, J.H., and Priess, J.R. 1992. Cell interactions involved in development of the bilaterally symmetrical intestinal valve cells during embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 116(4): 1113-1122.
- Brenner, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77(1): 71-94.
- Carroll, S.B. 1995. Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates. *Nature* 376(6540): 479-485.

- Cheng, N.N., Kirby, C.M., and Kemphues, K.J. 1995. Control of cleavage spindle orientation in *Caenorhabditis elegans*: the role of the genes *par-2* and *par-3*. *Genetics* 139(2): 549-559.
- Chitwood, B.G. 1937. A revised classification of the Nematoda. In: Papers on helminthology, 30 year jubileum KJ Skrzabin, edited by Anon, All-Union Lenin Academy of Agricultural Sciences, Moskau: 67-79.
- Chitwood, B.G. 1957. The english word "Nema" revisited. *Systematic Zoology* 6: 184-186.
- Chitwood, B.G. 1958. The designation of official names for higher taxa of invertebrates. *Bulletin of Zoological Nomenclature* 15: 860-895.
- Chitwood, B.G. and Chitwood, M.B. 1933. The characters of a protonematode. *Journal of Parasitology* 20: 130.
- Chitwood, B.G. and Chitwood, M.B. 1950. An Introduction to nematology. University Park Press, Baltimore.
- Christensen, B.M., Li, J., Chen, C.C., and Nappi, A.J. 2005. Melanization immune responses in mosquito vectors. *Trends Parasitol* 21(4): 192-199.
- Cobb, N.A. 1919. The orders and classes of nemas - Contributions to a science of nematology. Contributions to a science of nematology, 1914-1935 by N.A. Cobb: 212-216.
- Cole, T. and Schierenberg, E. 1986. Laser microbeam-induced fixation for electromicroscopy: Visualisation of transient developmental features in nematode embryos. *Experientia* 42: 1046-1048.
- Conklin, E.G. 1905. The organization and cell lineage of the ascidian egg. *J Acad Nat Sci Philadelphia* 13: 1-119.
- Convey, P. and McInnes, S.J. 2005. Exceptional tardigrade-dominated ecosystems in Ellsworth Land, Antarctica. *Ecology* 86: 519-527.
- Costello, D.P. 1961. On the orientation of centrioles in dividing cells, and its significance: a new contribution to spindle mechanics. *Biol Bull Mar Biol Lab, Woods Hole* 120: 285-312.
- Cowan, A.E. and McIntosh, J.R. 1985. Mapping the distribution of differentiation potential for intestine, muscle, and hypodermis during early development in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 41(3): 923-932.
- Cowan, C.R. and Hyman, A.A. 2004a. Asymmetric cell division in *C. elegans*: cortical polarity and spindle positioning. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 427-453.
- Cowan, C.R. and Hyman, A.A. 2004b. Centrosomes direct cell polarity independently of microtubule assembly in *C. elegans* embryos. *Nature* 431(7004): 92-96.
- Cowing, D. and Kenyon, C. 1996. Correct Hox gene expression established independently of position in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 382(6589): 353-356.
- De Ley, P. and Blaxter, M.L. 2002. Systematic Position and Phylogeny. In: D.L. Lee (ed) *The Biology of Nematodes* Taylor and Francis, London: 1-30.
- Deppe, U., Schierenberg, E., Cole, T., Krieg, C., Schmitt, D., Yoder, B., and von Ehrenstein, G. 1978. Cell lineages of the embryo of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 75(1): 376-380.
- Dolinski, C., Baldwin, J.G., and Thomas, W.K. 2001. Comparative survey of early embryogenesis of Secernentea (Nematoda), with phylogenetic implications. *Can J Zool* 79(1): 82-94.
- Dorris, M., De Ley, P., and Blaxter, M.L. 1999. Molecular analysis of nematode diversity and the evolution of parasitism. *Parasitol Today* 15(5): 188-193.
- Duellman, W.E. and Trueb, L. 1986. *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill, Inc New York.
- Dyson, J., Grahame, J., and Evennett, P.J. 1994. The apical complex of the gregarine *Digyalum oweni* (Protozoa: Apicomplexa). *Journal of Natural History* 28: 1-7.
- Ewald, V. 2007. Vergleichende und experimentelle Untersuchungen zur Embryonalentwicklung von freilebenden und parasitären Nematoden. Dissertation an der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Fioroni, P. 1987. *Allgemeine und vergleichende Embryologie der Tiere - Ein Lehrbuch*. Springer-Verlag, Berlin.

- Gabriel, W.N., McNuff, R., Patel, S.K., Gregory, T.R., Jeck, W.R., Jones, C.D., and Goldstein, B. 2007. The tardigrade *Hypsibius dujardini*, a new model for studying the evolution of development. *Dev Biol* 312(2): 545-559.
- Gibbons, L.M. 2002. General Organisation. In: D.L. Lee (ed.) *The Biology of Nematodes* Taylor and Francis, London.
- Gödde, T. 2001. Untersuchung zur Verbreitung, Anatomie und Entwicklung freilebender Nematoden. Staatsexamensarbeit - Universität Köln.
- Goldstein, B. 1992. Induction of gut in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Nature* 357(6375): 255-257.
- Goldstein, B. 1993. Establishment of gut fate in the E lineage of *C. elegans*: the roles of lineage-dependent mechanisms and cell interactions. *Development* 118(4): 1267-1277.
- Goldstein, B. 1995. An analysis of the response to gut induction in the *C. elegans* embryo. *Development* 121(4): 1227-1236.
- Goldstein, B., Frisse, L.M., and Thomas, W.K. 1998. Embryonic axis specification in nematodes: evolution of the first step in development. *Curr Biol* 8(3): 157-160.
- Goldstein, B. and Hird, S.N. 1996. Specification of the anteroposterior axis in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 122(5): 1467-1474.
- Gönczy, P. and Rose, L.S. 2005. Asymmetric cell division and axis formation in the embryo. In: *The C. elegans Research Community* (eds) *Wormbook*, doi/101895/wormbook1301, <http://www.wormbook.org>.
- Gould, S.J. 1977. *Ontogeny and Phylogeny*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Gould, S.J. 2002. *The Structure of Evolutionary Theory*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Grill, S.W., Gönczy, P., Stelzer, E.H., and Hyman, A.A. 2001. Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Nature* 409(6820): 630-633.
- Grill, S.W., Howard, J., Schaffer, E., Stelzer, E.H., and Hyman, A.A. 2003. The distribution of active force generators controls mitotic spindle position. *Science* 301(5632): 518-521.
- Grill, S.W. and Hyman, A.A. 2005. Spindle positioning by cortical pulling forces. *Dev Cell* 8(4): 461-465.
- Haeckel, E. 1866. *Generelle Morphologie der Organismen. Allgemeine Grundzüge der organischen Formen-Wissenschaft, mechanisch begründet durch die von Charles Darwin reformirte Descendenz-Theorie*. Georg Reimer, Berlin.
- Hansen, A. 2004. *Bioinformatik - Ein Leitfaden für Naturwissenschaftler*. Birkenhäuser Verlag, Berlin.
- Hao, Y., Boyd, L., and Seydoux, G. 2006. Stabilization of cell polarity by the *C. elegans* RING protein PAR-2. *Dev Cell* 10(2): 199-208.
- Hejnal, A. and Schnabel, R. 2005. The eutardigrade *Thulinia stephaniae* has an indeterminate development and the potential to regulate early blastomere ablations. *Development* 132(6): 1349-1361.
- Henning, W. 1950. *Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik*. Deutscher Zentralverlag, Berlin.
- Hibino, T., Nishikata, T., and Nishida, H. 1998. Centrosome-attracting body: a novel structure closely related to unequal cleavages in the ascidian embryo. *Dev Growth Differ* 40(1): 85-95.
- Hird, S.N. and White, J.G. 1993. Cortical and cytoplasmic flow polarity in early embryonic cells of *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 121(6): 1343-1355.
- Hobert, O. and Bulow, H. 2003. Development and maintenance of neuronal architecture at the ventral midline of *C. elegans*. *Curr Opin Neurobiol* 13(1): 70-78.
- Holterman, M., van der Wurff, A., van den Elsen, S., van Megen, H., Bongers, T., Holovachov, O., Bakker, J., and Helder, J. 2006. Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown Clades. *Mol Biol Evol* 23(9): 1792-1800.

- Hopper, D.J. 1990. Extraction and processing of plant and soil nematodes. In: Luc, M, Sikorn, R A, and Bridge J, (eds) Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture CAB International, Oxon.: 45-68.
- Houthoofd, W., Jacobsen, K., Mertens, C., Vangestel, S., Coomans, A., and Borgonie, G. 2003. Embryonic cell lineage of the marine nematode *Pellioditis marina*. Dev Biol 258(1): 57-69.
- Houthoofd, W., Willems, M., Vangestel, S., Mertens, C., Bert, W., and Borgonie, G. 2006. Different roads to form the same gut in nematodes. Evol Dev 8(4): 362-369.
- Hung, T.J. and Kemphues, K.J. 1999. PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in *Caenorhabditis elegans* embryos. Development 126(1): 127-135.
- Hutter, H. and Schnabel, R. 1994. *glp-1* and inductions establishing embryonic axes in *C. elegans*. Development 120(7): 2051-2064.
- Hutter, H. and Schnabel, R. 1995a. Establishment of left-right asymmetry in the *Caenorhabditis elegans* embryo: a multistep process involving a series of inductive events. Development 121(10): 3417-3424.
- Hutter, H. and Schnabel, R. 1995b. Specification of anterior-posterior differences within the AB lineage in the *C. elegans* embryo: a polarising induction. Development 121(5): 1559-1568.
- Hyman, A.A. 1989. Centrosome movement in the early divisions of *Caenorhabditis elegans*: a cortical site determining centrosome position. J Cell Biol 109(3): 1185-1193.
- Hyman, A.A. and White, J.G. 1987. Determination of cell division axes in the early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans*. J Cell Biol 105(5): 2123-2135.
- Hyman, L.H. 1940. The Invertebrates. McGraw-Hill, NY.
- Jeffery, W.R. and Swalla, B.J. 1997. Tunicates. In: SL Gilbert & AM Raunio (eds) Embryology - Constructing the Organism Sinauer Associates, Inc Sunderland: 331-364.
- Junkersdorf, B. and Schierenberg, E. 1992. Embryogenesis in *C. elegans* after elimination of individual blastomeres or induced alteration of the cell-division order. Roux's Arch Dev Biol 202: 17-22.
- Justine, J.L. 2002. Male and Female Gametes and Fertilisation. In: D.L. Lee (ed.) The Biology of Nematodes Taylor and Francis, London.
- Keating, H.H. and White, J.G. 1998. Centrosome dynamics in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. J Cell Sci 111 (Pt 20): 3027-3033.
- Kemphues, K. and Strome, S. 1997. Fertilization and Establishment of Polarity in the Embryo. In: Riddle, DL, Blumenthal, T, Meyer, BJ, Priess, J (eds) C Elegans II Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Kimble, J. and Crittenden, S.L. 2005. Germline proliferation and its control. WormBook: 1-14.
- Kimble, J. and Hirsh, D. 1979. The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. Dev Biol 70(2): 396-417.
- Krieg, C., Cole, T., Deppe, U., Schierenberg, E., Schmitt, D., Yoder, B., and von Ehrenstein, G. 1978. The cellular anatomy of embryos of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Analysis and reconstruction of serial section electron micrographs. Dev Biol 65(1): 193-215.
- Kuriyama, R., Besse, C., Geze, M., Omoto, C.K., and Schrevel, J. 2005. Dynamic organization of microtubules and microtubule-organizing centers during the sexual phase of a parasitic protozoan, *Lecudina tuzetae* (Gregarine, Apicomplexa). Cell Motil Cytoskeleton 62(4): 195-209.
- Lahl, V., Halama, C., and Schierenberg, E. 2003. Comparative and experimental embryogenesis of Plectidae (Nematoda). Dev Genes Evol 213(1): 18-27.
- Laufer, J.S., Bazzicalupo, P., and Wood, W.B. 1980. Segregation of developmental potential in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. Cell 19(3): 569-577.
- Laugsch, M. and Schierenberg, E. 2004. Differences in maternal supply and early development of closely related nematode species. Int J Dev Biol 48(7): 655-662.
- Lechner, M. 1966. Untersuchungen zur Embryonalentwicklung des Rädertieres *Asplanchna girodi* De Guerne. Roux's Archiv für Entwicklungsmechanik 157: 117-173.

- Lee, M. 2002. Life Cycles. In: D.L. Lee (ed.) The Biology of Nematodes Taylor and Francis, London.
- Lorenzen, S. 1994. The phylogenetic systematics of freeliving nematodes. The Ray Society, London.
- Malakhov, V.V. 1994. Nematodes Structure, Development, Classification and Phylogeny: Smithsonian Institution Press, Washington.
- Malakhov, V.V. 1998. Embryological and histological peculiarities of the order Enoplida, a primitive group of nematodes. Russian Journal of Nematology 6: 41-46.
- Malakhov, V.V., Romashov, B.V., and Spiridonov, S.E. 1984. Embryonic development of *Trichocephalus trichiurus* and *Eucoleus oesophagicola* (Nematoda, Trichocephalida). Parazitologiya 18(4): 286-290.
- Malakhov, V.V. and Spiridonov, S.E. 1984. The embryogenesis of *Gordius* sp. from Turkmenia, with special reference to the position of the Nematomorpha in the animal kingdom. Zool Zh 63: 1285-1296.
- Manzanilla-López, R.H., Evans, K., and Bridge, J. 2004. Plant diseases caused by nematodes. In: Chen, ZX, Chen, WY, Chen, SY, Dickson, DW (Eds), Nematology: Advances and Perspectives Vol 2: Nematode Management and Utilization CABI Publishing: 637-716.
- McDonald, K. and Müller-Reichert, T. 2002. Cryomethods for thin section electron microscopy. Methods Enzymol 351: 96-123.
- McDonald, K.L., Morpew, M., Verkade, P., and Muller-Reichert, T. 2007. Recent advances in high-pressure freezing: equipment- and specimen-loading methods. Methods Mol Biol 369: 143-173.
- Meglitsch, P. and Schram, F.R. 1991. Invertebrate Zoology. Oxford University Press, NY.
- Meinhardt, H. 2004. Different strategies for midline formation in bilaterians. Nat Rev Neurosci 5(6): 502-510.
- Meldal, B.H., Debenham, N.J., De Ley, P., De Ley, I.T., Vanfleteren, J.R., Vierstraete, A.R., Bert, W., Borgonie, G., Moens, T., Tyler, P.A., Austen, M.C., Blaxter, M.L., Rogers, A.D., and Lamshead, P.J. 2007. An improved molecular phylogeny of the Nematoda with special emphasis on marine taxa. Mol Phylogenet Evol 42(3): 622-636.
- Mittwoch, U. 1978. Parthenogenesis. J Med Genet 15(3): 165-181.
- Morrisette, N.S. and Sibley, L.D. 2002. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. Microbiol Mol Biol Rev 66(1): 21-38; table of contents.
- Moussian, B. and Roth, S. 2005. Dorsoventral axis formation in the *Drosophila* embryo - shaping and transducing a morphogen gradient. Curr Biol 15(21): 887-899.
- Müller, H. 1903. Beitrag zur Embryonalentwicklung von *Ascaris megalocephala*. Zoologica 41(1-27).
- Munn, E.A. and Munn, P.D. 2002. Feeding and Digestion. In: D.L. Lee (ed.) The Biology of Nematodes Taylor and Francis, London.
- Nance, J., Munro, E.M., and Priess, J.R. 2003. *C. elegans* PAR-3 and PAR-6 are required for apicobasal asymmetries associated with cell adhesion and gastrulation. Development 130(22): 5339-5350.
- Nance, J. and Priess, J. 2004. Gastrulation in Nematodes. In: C.D. Stern (ed) Gastrulation: From Cells to Embryo.
- Nance, J. and Priess, J.R. 2002. Cell polarity and gastrulation in *C. elegans*. Development 129(2): 387-397.
- Nguyen-Ngoc, T., Afshar, K., and Gonczy, P. 2007. Coupling of cortical dynein and G alpha proteins mediates spindle positioning in *Caenorhabditis elegans*. Nat Cell Biol 9(11): 1294-1302.
- Nielsen, C. 2001. The phylogenetic position of the Arthropoda. In: R A Fortey & R H Thomas (eds) Arthropod Relationships The Systematics Association, London.: 11-22.
- Nielsen, C. 2003. Proposing a solution to the Articulata–Ecdysozoa controversy. Zoologica Scripta 32: 475-482.
- Nishida, H. 1992. Regionality of egg cytoplasm that promotes muscle differentiation in embryo of the ascidian *Halocynthia roretzi*. Development 116: 521-529.

- Nishikata, T., Hibino, T., and Nishida, H. 1999. The centrosome-attracting body, microtubule system, and posterior egg cytoplasm are involved in positioning of cleavage planes in the ascidian embryo. *Dev Biol* 209(1): 72-85.
- Patalano, S., Pruliere, G., Prodon, F., Paix, A., Dru, P., Sardet, C., and Chenevert, J. 2006. The aPKC-PAR-6-PAR-3 cell polarity complex localizes to the centrosome attracting body, a macroscopic cortical structure responsible for asymmetric divisions in the early ascidian embryo. *J Cell Sci* 119(Pt 8): 1592-1603.
- Perez Pacheco, R., Rodríguez-Hernández, C., Lara-Reyna, J., Ruiz-Vega, J., and Montes-Belmont, R. 2005. Control of the mosquito *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) with *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) in Oaxaca, Mexico. *Biological Control* 2005 32(1): 137-142.
- Petersen, J.J., Chapman, H.C., Willis, O.R., and Fukuda, T. 1978. Release of *Romanomermis culicivorax* for the control of *Anopheles albimanus* in El Salvador II. Application of the nematode. *Am J Trop Med Hyg* 27(6): 1268-1273.
- Philippe, H., Lartillot, N., and Brinkmann, H. 2005. Multigene analyses of bilaterian animals corroborate the monophyly of Ecdysozoa, Lophotrochozoa, and Protostomia. *Mol Biol Evol* 22(5): 1246-1253.
- Platt, H.M. 1994. Foreword. In: Lorenzen S., (editor). The phylogenetic systematics of free-living nematodes. London: The Ray Society.
- Poinar, G.O. and Camino, N.B. 1986. *Strelkovimermis spiculatus* n. sp. (Mermithidae: Nematoda) parasitizing *Aedes albifasciatus* Mac. (Culicidae: Diptera) in Argentina. *J Nematol* 18(13): 317-319.
- Priess, J.R., Schnabel, H., and Schnabel, R. 1987. The *glp-1* locus and cellular interactions in early *C. elegans* embryos. *Cell* 51(4): 601-611.
- Priess, J.R. and Thomson, J.N. 1987. Cellular interactions in early *C. elegans* embryos. *Cell* 48(2): 241-250.
- Raff, R.A. 1996. The Shape of Life: Genes, Development and the Evolution of the Animal Form: University of Chicago Press.
- Reese, K.J., Dunn, M.A., Waddle, J.A., and Seydoux, G. 2000. Asymmetric segregation of PIE-1 in *C. elegans* is mediated by two complementary mechanisms that act through separate PIE-1 protein domains. *Mol Cell* 6(2): 445-455.
- Renault, A.D. and Lehmann, R. 2006. Follow the fatty brick road: lipid signaling in cell migration. *Curr Opin Genet Dev* 16(4): 348-354.
- Renault, A.D., Sigal, Y.J., Morris, A.J., and Lehmann, R. 2004. Soma-germ line competition for lipid phosphate uptake regulates germ cell migration and survival. *Science* 305(5692): 1963-1966.
- Romeis. 1989. Romeis - Mikroskopische Technik. 17. Auflage, Urban & Schwarzenberg.
- Roux, W. 1888. Contributions to the developmental mechanics of the embryo. On the artificial production of half embryos by destruction of one of the first two blastomeres and the later development (postgeneration) of the missing half of the body. In: Foundations of Experimental Embryology BH Willier and JM Oppenheimer (eds), 1974 Hafner, NY: 2-32.
- Rudolphi, C.A. 1808. Entozoorum sive vermium intestinalium historia naturalis. 1.
- Sadler, B. 2000. Untersuchungen zur Entwicklung von Nematoden der Familie Cephalobidae: Meiose, Eiaktivierung und frühe Furchung. Staatsexamensarbeit - Universität Köln.
- Sano, H., Renault, A.D., and Lehmann, R. 2005. Control of lateral migration and germ cell elimination by the *Drosophila melanogaster* lipid phosphate phosphatases Wunen and Wunen 2. *J Cell Biol* 171(4): 675-683.
- Schierenberg, E. 1986. Developmental strategies during early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans*. *J Embryol Exp Morphol* 97 Suppl: 31-44.
- Schierenberg, E. 1987. Reversal of cellular polarity and early cell-cell interaction in the embryos of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 122(2): 452-463.
- Schierenberg, E. 1997. [Specification of cell destiny in early *Caenorhabditis elegans* embryo]. *Naturwissenschaften* 84(2): 55-64.
- Schierenberg, E. 2001. Three sons of fortune: early embryogenesis, evolution and ecology of nematodes. *Bioessays* 23(9): 841-847.

- Schierenberg, E. 2004. *Caenorhabditis elegans*: Determination of Germ Cell Fate. Encyclopedia of Life Sciences www.els.net.
- Schierenberg, E. 2005. Unusual cleavage and gastrulation in a freshwater nematode: developmental and phylogenetic implications. *Dev Genes Evol* 215(2): 103-108.
- Schierenberg, E. 2006. Embryological variation during nematode development. In: The *C. elegans* Research Community (eds) Wormbook, doi 10.1895/wormbook.1551, <http://www.wormbook.org>.
- Schierenberg, E., Bossinger, O., Skiba, F., and Kutzowitz, M. 1997/98. Pattern formation and cell specification in nematode embryos: A theme with considerable variations. *Zoology* 100: 320-327.
- Schierenberg, E. and Lahl, V. 2004. Embryology and phylogeny of nematodes. In: Cock, RC and Hunt, DJ (eds) *Nematology Monographs & Perspectives*, Vol 2: Brill, Leiden: pp 667-679.
- Schierenberg, E. and Strome, S. 1993. The establishment of embryonic axes and determination of cell fates in embryos of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Seminars in Dev Biol* 3: 25-33.
- Schlicht, P. and Schierenberg, E. 1991. Altered establishment of cell lineages in *Caenorhabditis elegans* embryo after suppression of the first cleavage supports a concentration-dependent decision mechanism. *Roux's Arch Dev Biol* 199(8): 437-448.
- Schnabel, H. and Priess, J. 1997. Specification of Cell Fates in the Early Embryo. In: Riddle, DL, Blumenthal, T, Meyer, BJ, Priess, J (eds) *C. elegans II* Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Schnabel, R. 1994. Autonomy and nonautonomy in cell fate specification of muscle in the *Caenorhabditis elegans* embryo: a reciprocal induction. *Science* 263(5152): 1449-1452.
- Schnabel, R. 1995. Duels without obvious sense: counteracting inductions involved in body wall muscle development in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Development* 121(7): 2219-2232.
- Schnabel, R., Bischoff, M., Hintze, A., Schulz, A.K., Hejnowicz, A., Meinhardt, H., and Hutter, H. 2006. Global cell sorting in the *C. elegans* embryo defines a new mechanism for pattern formation. *Dev Biol* 294(2): 418-431.
- Schnabel, R., Hutter, H., Moerman, D., and Schnabel, H. 1997. Assessing normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* using a 4D microscope: variability of development and regional specification. *Dev Biol* 184(2): 234-265.
- Simske, J.S. and Hardin, J. 2001. Getting into shape: epidermal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Bioessays* 23(1): 12-23.
- Skiba, F. and Schierenberg, E. 1992. Cell lineages, developmental timing, and spatial pattern formation in embryos of free-living soil nematodes. *Dev Biol* 151(2): 597-610.
- Steinhauer, J. and Kalderon, D. 2006. Microtubule polarity and axis formation in the *Drosophila* oocyte. *Dev Dyn* 235(6): 1455-1468.
- Stent, G.S. 1985. The role of cell lineage in development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 312(1153): 3-19.
- Stern, C.D. 2004. *Gastrulation - From Cells to Embryo*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Strome, S., Martin, P., Schierenberg, E., and Paulsen, J. 1995. Transformation of the germ line into muscle in *mes-1* mutant embryos of *C. elegans*. *Development* 121(9): 2961-2972.
- Strome, S. and Wood, W.B. 1982. Immunofluorescence visualization of germ-line-specific cytoplasmic granules in embryos, larvae, and adults of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 79(5): 1558-1562.
- Strome, S. and Wood, W.B. 1983. Generation of asymmetry and segregation of germ-line granules in early *C. elegans* embryos. *Cell* 35(1): 15-25.
- Sulston, J.E. and Horvitz, H.R. 1977. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56(1): 110-156.
- Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G., and Thomson, J.N. 1983. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 100(1): 64-119.

- Tabuse, Y., Izumi, Y., Piano, F., Kemphues, K.J., Miwa, J., and Ohno, S. 1998. Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 125(18): 3607-3614.
- Tsou, M.F., Hayashi, A., DeBella, L.R., McGrath, G., and Rose, L.S. 2002. LET-99 determines spindle position and is asymmetrically enriched in response to PAR polarity cues in *C. elegans* embryos. *Development* 129(19): 4469-4481.
- Tsou, M.F., Ku, W., Hayashi, A., and Rose, L.S. 2003. PAR-dependent and geometry-dependent mechanisms of spindle positioning. *J Cell Biol* 160(6): 845-855.
- von Linné, C. 1767. *Systema Naturae*. <http://books.google.com/books?id=Ix0AAAAAQAAJ>.
- von Ehrenstein, G. and Schierenberg, E. 1980. Cell Lineages and Development of *C. elegans* and other Nematodes. In: M. Zuckerman (ed.), *Nematodes as Biological Models*; Volume 1.
- Voronov, D.A. 1999. The embryonic development of *Pontonema vulgare* (Enoplida: Oncholaimidae) with a discussion of nematode phylogeny. *Russ J Nematol* 7: 105-114.
- Voronov, D.A. and Panchin, Y.V. 1995. The early stages of cleavage in the free-living marine nematode *Enoplus brevis* (Enoplida, Enoplidae) in normal and experimental conditions. *Zoologicheskii Zhurnal [Zoological Journal]* 74(6): 31-38.
- Voronov, D.A. and Panchin, Y.V. 1998. Cell lineage in marine nematode *Enoplus brevis*. *Development* 125(1): 143-150.
- Waddle, J.A., Cooper, J.A., and Waterston, R.H. 1994. Transient localized accumulation of actin in *Caenorhabditis elegans* blastomeres with oriented asymmetric divisions. *Development* 120(8): 2317-2328.
- Wallenfang, M.R. and Seydoux, G. 2000. Polarization of the anterior-posterior axis of *C. elegans* is a microtubule-directed process. *Nature* 408(6808): 89-92.
- Weisblat, D.A., Sawyer, R.T., and Stent, G.S. 1978. Cell lineage analysis by intracellular injection of a tracer enzyme. *Science* 202(4374): 1295-1298.
- Whittaker, J.R. 1983. Quantitative regulation of acetylcholinesterase development in the muscle lineage cells of cleavage-arrested ascidian embryos. *J Embryol Exp Morphol* 76: 235-250.
- Wiegner, O. 1998. Zellkommunikation und Zellspezifikation im Nematodenembryo. Untersuchungen an *Caenorhabditis elegans* und *Acrobeloides nanus*. Dissertation an der Universität Köln.
- Wiegner, O. and Schierenberg, E. 1998. Specification of gut cell fate differs significantly between the nematodes *Acrobeloides nanus* and *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 204(1): 3-14.
- Wiegner, O. and Schierenberg, E. 1999. Regulative development in a nematode embryo: a hierarchy of cell fate transformations. *Dev Biol* 215(1): 1-12.
- Wolf, N., Priess, J., and Hirsh, D. 1983. Segregation of germline granules in early embryos of *Caenorhabditis elegans*: an electron microscopic analysis. *J Embryol Exp Morphol* 73: 297-306.
- Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessell, T., Lawrence, P., and Meyerowitz, E. 1999. *Entwicklungsbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Berlin.
- Wood, W.B. 1988. Determination of pattern and fate in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol (N Y)* 125(1): 57-78.
- Wood, W.B. 1991. Evidence from reversal of handedness in *C. elegans* embryos for early cell interactions determining cell fates. *Nature* 349(6309): 536-538.
- Wray, G.A. 1997. Echinoderms. In: SL Gilbert & AM Raunio (eds) *Embryology - Constructing the Organism* Sinauer Associates, Inc Sunderland.
- Wu, J.C. and Rose, L.S. 2007. PAR-3 and PAR-1 inhibit LET-99 localization to generate a cortical band important for spindle positioning in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Mol Biol Cell* 18(11): 4470-4482.
- Wyllie, C. 1999. Germ cells. *Cell* 96(2): 165-174.
- Zell, H. 1993. Taxonomie und Phylogenie von Nematoden. Die Gattung *Plectus* Bastian, 1865 sensu latu (Nematoda, *Plectidae*) - Ein Beitrag zu Ökologie, Biogeographie, Phylogenie und Taxonomie der Plectidae. *Andrias* 11.

- Zhao, Z., Boyle, T.J., Bao, Z., Murray, J.I., Mericle, B., and Waterston, R.H. 2008. Comparative analysis of embryonic cell lineage between *Caenorhabditis briggsae* and *Caenorhabditis elegans*. Dev Biol 314(1): 93-99.
- zur Strassen, O. 1896. Embryonalentwicklung der *Ascaris megalocephala*. Arch Entwicklungsmech 3: 27-105.

9. Anhänge

Erklärung:

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass die – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Einhard Schierenberg betreut worden.

Teilpublikationen:

- 1) Schulze, J., Schierenberg, E. (2008)
Cellular pattern formation, establishment of polarity and segregation of colored cytoplasm in embryos of the nematode *Romanomermis culicivorax*.
Dev. Biol. 315 (2): 426-436.
- 2) Schierenberg, E., Schulze, J. (2008)
Many roads lead to Rome: different ways to construct a nematode.
In: Minelli, A. and Fusco, G. (eds.)
Evolving Pathways: Key themes in Evolutionary Developmental Biology
261-280

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Einhard Schierenberg möchte ich für die Betreuung dieser Arbeit, für seine stete Diskussionsbereitschaft, seine Unterstützung und Anregungen und für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre während der letzten Jahre danken.

Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. Stefan Berking für einige anregende Diskussionen.

Dr. Edward Platzer von der University of Riverside für die freundliche Bereitstellung von *Romanomermis culicivorax*, *Romanomermis iyengari* und *Strelkomermis spiculatus*.

Dr. Thomas-Müller Reichert vom MPI für Molecular Cell Biology and Genetics in Dresden für die Fixierung von *R. culicivorax* und die Möglichkeit die ausgezeichnete EM zu nutzen.

Prof. Dr. H. Mehlhorn von der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die freundliche Bereitstellung von *Trichuris muris*.

Den Mitarbeitern des ZMMK für die Unterstützung bei der Paraffineinbettung von *R. culicivorax* und die Möglichkeit Dünnschnitte durchzuführen.

Elisabeth Trojtza für ihren steten Einsatz die Kulturen der in dieser Arbeit verwendeten Rhabditiden und Plectiden zu halten.

Julia Camps und Peter Heger für Korrekturen und einige anregende Diskussionen.

Den Mitarbeitern des Institutes, Julia Camps, Vera Ewald, Peter Heger, Michael Kroiher, Renate Seiler, Elisabeth Trojtza, für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung, Motivation und Liebe.

Ein Teil dieser Arbeit wurde im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 572 (Commitment of cell arrays and cell type specification, Projektbereich B. Zelltypspezifizierung) angefertigt.